

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Strukturell modifizierte  
tumorassoziierte Antigene des MUC1  
– Typs zur Entwicklung  
vollsynthetischer Krebsvakzine**

Florian Karch

aus

Bad Kreuznach, Deutschland

2015

### Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Frau Prof. Dr. Hoffmann-Röder betreut.

### Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 16.11.2015.

.....

Dissertation eingereicht am 08.03.2015

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Hoffmann-Röder

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Carell

Mündliche Prüfung am 13.07.2015







# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>11</b>
2.1	Krebs .....	11
2.2	Mucine und aktive Krebsimmuntherapie.....	13
2.3	Modifikationsmöglichkeiten in der MUC1-Struktur .....	19
<b>3</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>Allgemeiner Teil .....</b>	<b>37</b>
4.1	Synthese der Galactosebausteine .....	37
4.2	Synthese der Sialinsäurebausteine .....	40
4.3	Synthese der $\beta^3$ -homo-Threonin-Glycokonjugate .....	42
4.4	Synthese von fluorierten $\beta^3$ -homo-Serinbausteinen.....	52
4.5	Synthese PNA-ähnlicher Glycoverbindungen .....	57
4.6	Synthese eines nicht-immunogenen Linkers .....	64
4.7	Synthese von (Glyco)peptiden aus der tandem repeat-Domäne des epithelialen Mucins MUC1 .....	65
4.8	Stabilitätstests und Strukturuntersuchungen .....	79
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>85</b>
5.1	Geräte und Materialien .....	85
5.2	Synthesen zu 4.1 – Galactosebausteine .....	88
5.3	Synthesen zu 4.2 – Sialinsäurebausteine .....	94
5.4	Synthesen zu 4.3 – $\beta^3$ -homo-Threonin-Glycokonjugate.....	98
5.5	Synthesen zu 4.4 – fluorierte $\beta^3$ -homo-Serinbausteine.....	130
5.6	Synthesen zu 4.5 – PNA-ähnliche Glycoverbindungen.....	136
5.7	Synthesen zu 4.6 – Synthese eines nicht-immunogenen Linkers .....	165
5.8	Synthesen zu 4.7 – Peptidsynthesen .....	169
5.9	Versuche zu 4.8 – Stabilitätstests.....	180
	<b>Danksagung.....</b>	<b>183</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>185</b>
	<b>Schemenverzeichnis.....</b>	<b>187</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>189</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>193</b>



# 1 Zusammenfassung

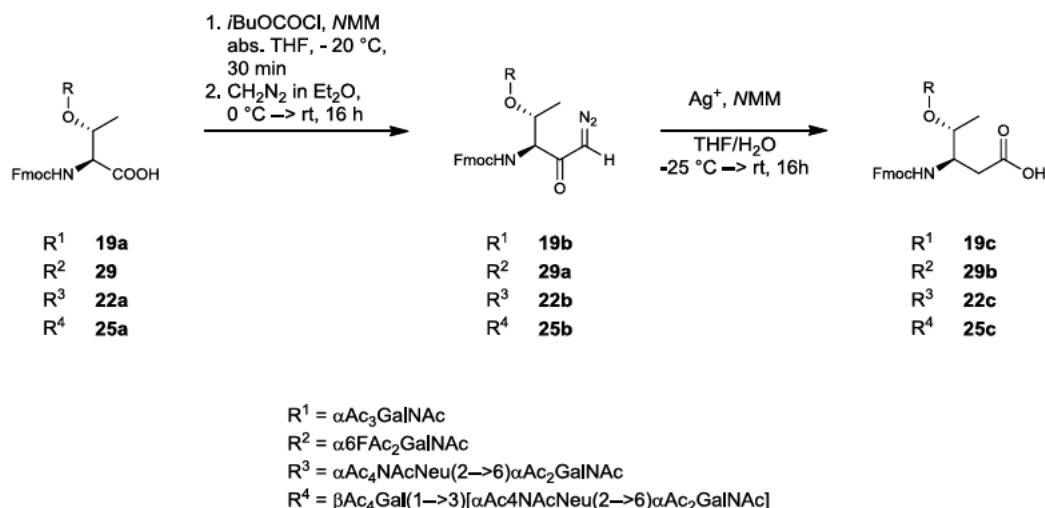
Krebs (ca. 26% in Deutschland) zählt nach Herz-Kreislaufkrankungen (ca. 40% in Deutschland) zu den zweithäufigsten Todesursachen weltweit. Es wird geschätzt, dass die Zahl der Erkrankungen bis 2050 um weitere 30% steigt. Die therapeutischen Möglichkeiten beschränken sich die derzeit auf chirurgische Eingriffe, Bestrahlungen oder die Chemotherapie, je nach Art und Ort der Krebserkrankung. Der Erfolg der genannten Therapiemöglichkeiten ist dabei stark vom Ort der Erkrankung, dem Grad der Metastasierung und einigen anderen Faktoren abhängig. Im Durchschnitt erkranken etwa 40% der Behandelten erneut oder versterben noch innerhalb der folgenden fünf Jahre (vgl. Kapitel 2.1)

Fehlende effiziente Therapiemöglichkeiten ließen in den letzten 30 Jahren die Forschungsbemühungen in Richtung neuer und divergenter Behandlungsmöglichkeiten ansteigen. Dabei rückten auch immuntherapeutische Ansätze immer mehr in den Vordergrund. Letztere sollten nicht nur als Prophylaxe sondern auch als Behandlungsmöglichkeit in akuten Fällen zur Verfügung stehen. Eine mögliche Zielstruktur bei der Bekämpfung einer Vielzahl epithelialer Krebsarten wie z.B. Brustkrebs stellt das humane transmembrane Glycoprotein MUC1 dar, das sich auf gesunden und malignen Zellen im Aufbau unterscheidet. Eine zentrale Rolle spielen dabei die tumorassoziierten Kohlenhydratantigene (*tumor-associated carbohydrate antigens*, TACA) hinsichtlich der Unterscheidung gesunder und maligner Zellen sowie als Bausteine zur Entwicklung von Krebsvakzinen auf Basis von Glycopeptiden (vgl. Kapitel 2.2)

Natürliche (Glyco)peptide weisen als Wirkstoffe jedoch den Nachteil auf, dass diese durch eine Vielzahl an Glycosidasen und Proteasen verdaut werden können und somit wichtige Informationen für das Immunsystem verloren gehen können. In der Literatur werden daher eine Vielzahl an Modifikationsmöglichkeiten für (Glyco)peptide vorgeschlagen, die deren metabolische Stabilität steigern können. Zu den Modifikationsmöglichkeiten zählen u.a. S- und C-Glycoside sowie  $\beta$ -Aminosäuren und Peptoide (vgl. Kapitel 2.3).

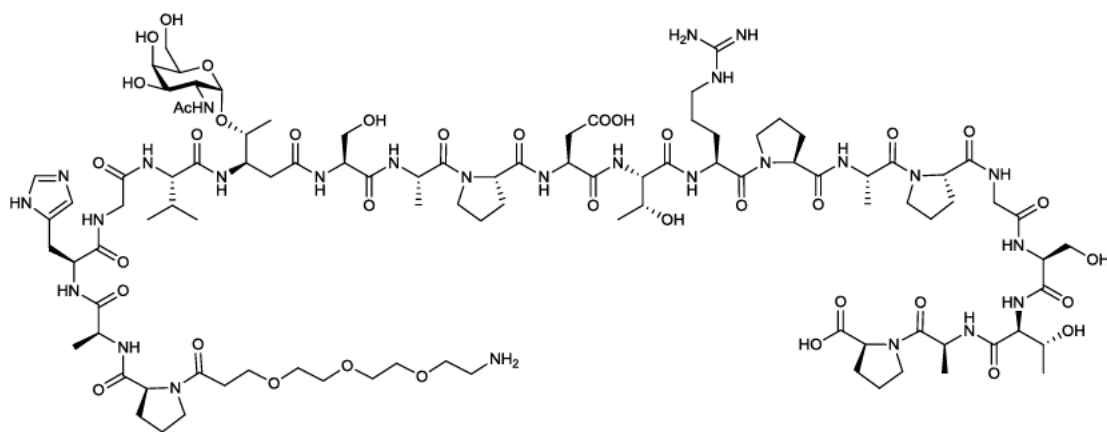
Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Darstellung von Glycosylaminosäuremimetika zur Herstellung metabolisch stabiler Peptide. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Substanzklassen untersucht. Zum einen wurde im Kapitel der  $\beta$ -Aminosäuren an die Diplomarbeit von 2009 angeknüpft und es wurden durch *Arndt-Eistert*-Homologisierungen die bisher in der Literatur unbekannten tumorassoziierten sTn- und sT-Analoga **22c** und **25c** als  $\beta^3$ -homo-Threoninkonjugate dargestellt. Damit sind alle vier entscheidenden TACAs des Mucins MUC1 erstmals als  $\beta$ -Aminosäurekonjugate zugänglich. Ebenso konnte erstmals ein fluorierter Vertreter des 6F-Tn-Analogons **29b** auf

Basis von  $\beta$ -Threonin synthetisiert werden (Schema 1.1). Diskussionswürdig bleiben die Ausbeuten, die bei den komplexeren Kohlenhydratresten stark sinken, womit die Synthese über die *Wolff*-Umlagerung keine adäquate, aber derzeit die einzige Methode zur Darstellung dieser Bausteine beschreibt.



Schema 1.1 Arndt-Eistert-Reaktion zu Vertretern der TACAs des MUC1.

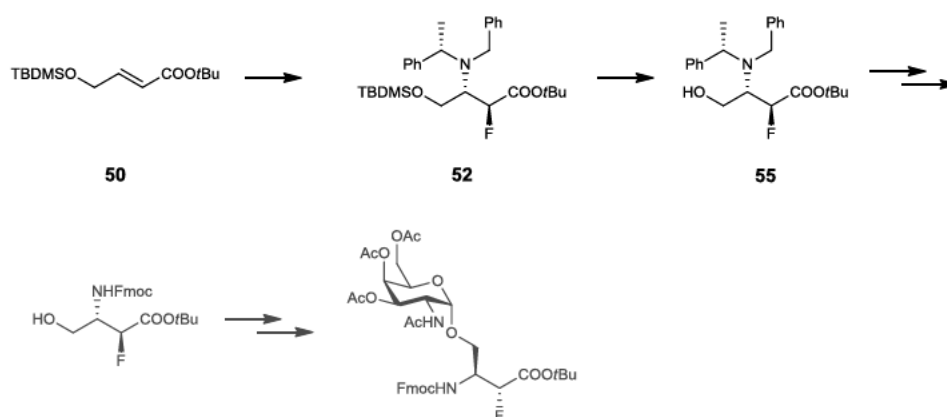
Es konnte zudem gezeigt werden, dass der Einbau von homo-Threonin-Glycokonjugaten in die MUC1 *tandem repeat unit* und damit die Darstellung von  $\alpha/\beta$ -Hybridpeptiden mit entsprechenden Glycosylaminosäuren möglich ist (vgl. Abb. 1.1). In dieser Arbeit wurden erste Vertreter dieser Verbindungsklasse hergestellt, die interessante Analoga tumorassoziierter Glycopeptidantigene darstellen.



93

Abb. 1.1 Erstes Glycopeptid des MUC1 20mers mit  $\beta$ -homo-Tn an Position 6.

Die Synthese einer Glycosylaminosäure auf Basis von fluoriertem  $\beta^3$ -homo-Serin **55** konnte nicht bis zum Ende durchgeführt werden, jedoch konnten sämtliche der hier geschilderten Synthesen von Corinna Jansen in guten Ausbeuten reproduziert werden. Somit steht ein neuer Zugang zu fluorierten Glycosylakzeptoren auf Basis von 2-Fluor- $\beta^3$ -homo-Serin zur Verfügung (Schema 1.2).



Schema 1.2 Darstellung fluorierter TACAs ausgehend von Alken **50**.

Eine weitere Substanzklasse, die als metabolisch stabile Peptidmimetika gelten, stellen die *N*-Amino-*N*-Acyl-Peptide (AA-Peptide) und deren Hybride dar. Diese Arbeit zeigt einen ersten Zugang zu neuartigen glycosylierten Vertretern dieser Verbindungsklasse auf. Dabei konnten Vertreter des Tn- **75** und **76**, T- **82** und des sTn-Antigens **79** und **80** erfolgreich synthetisiert werden, die sich in Flexibilität und in ihrem Abstand zum Peptidrückgrat unterscheiden.

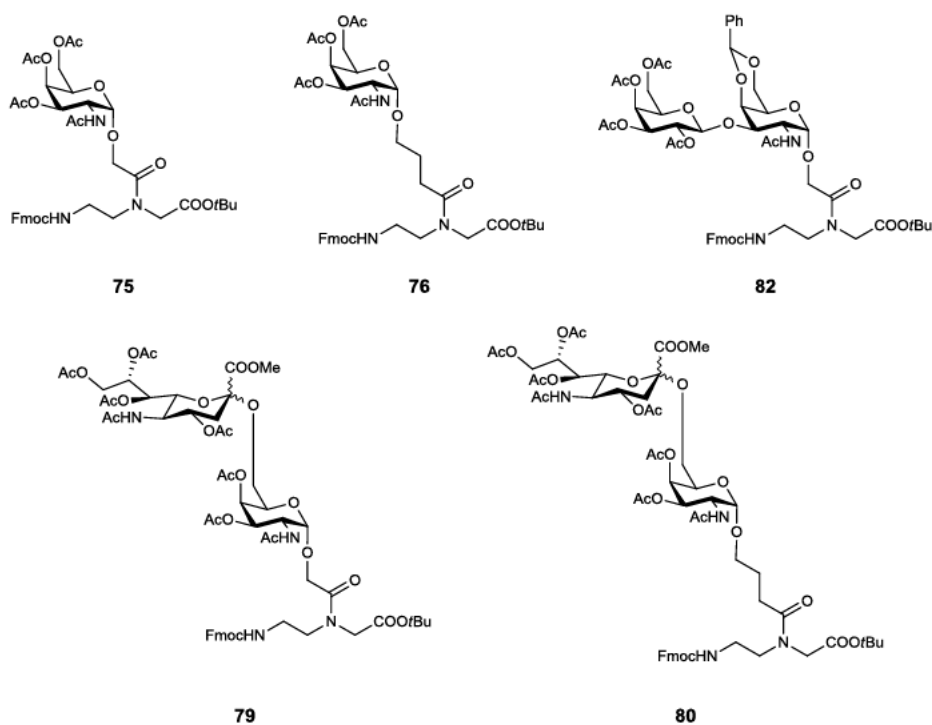


Abb. 1.2 PNA-Analoga des Tn-(**75** und **76**), T-(**82**) und sTn-Antigens (**79** und **80**)

Einige Vertreter der genannten Mimetika dienten als Bausteine für die MUC1-Festphasensynthese. So konnten erste Vertreter neuartiger  $\alpha/\beta$ -Hybridpeptide **95** und  $\alpha$ AAP/ $\alpha$ -Hybridpeptiden **97** erfolgreich erhalten werden (Abb. 1.3). Beide Klassen zeigen im Vergleich zur nicht modifizierten MUC1 *tandem repeat unit* **94** eine verbesserte enzymatische Stabilität in Bezug auf das Modellenzym Proteinase K.

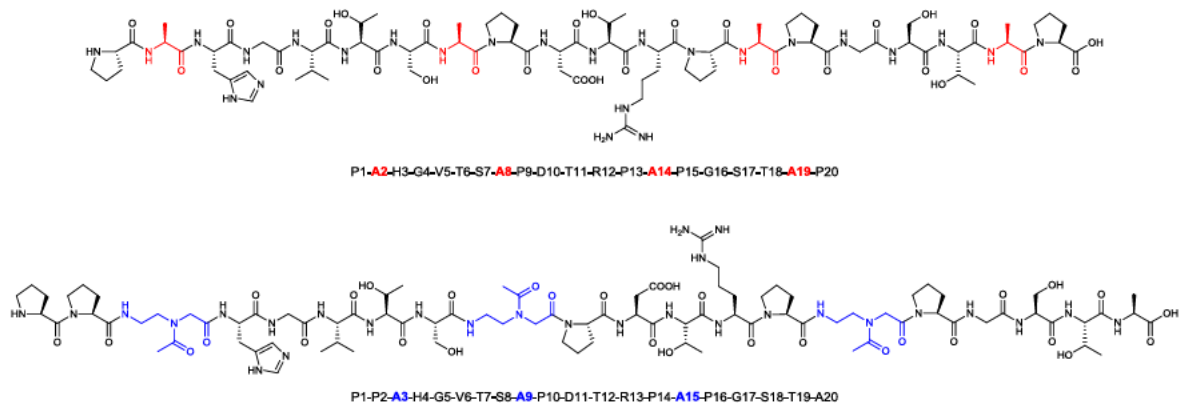


Abb. 1.3 Neue Peptidmimetika mit  $\beta$ -Aminosäuren oder  $\alpha$ AA-Aminosäuren.

Ein erster Versuch, das den Triethylenglycospacer enthaltende Glycopeptid **93** in humanem Blutserum zu verdauen, führte zu keiner Aussage bezüglich des Einflusses des  $\beta^3$ -homo-Tn-Analogons auf die metabolischen Stabilität. Das Referenzglycopeptid, das ebenso den Triethylenglycospacer trug, wurde unter den Reaktionsbedingungen ebenfalls nicht verdaut. Von einer stabilisierenden Wirkung des Triethylenglycospacers **89a**, der bereits in diversen Vakzinsynthesen eingesetzt wurde, auf einen potentiellen Verdau *in vivo* wurde bisher in der Literatur nicht berichtet.

Zukünftige Arbeiten müssen zeigen, ob die synthetisierten Glykokonjugate auch in Vakzinierungsexperimenten bestehen können.

## 2 Einleitung

### 2.1 Krebs

Im Jahr 2011 verstarben insgesamt 852.328 Menschen in der Bundesrepublik. Etwa 40% erlagen Herz-Kreislaufkrankungen, während 26% an Krebsleiden verstarben. Damit zählen Krebserkrankungen zur zweithäufigsten Todesursache in der BRD.<sup>[1]</sup> Innerhalb der letzten 30 Jahre stieg die Anzahl an Neuerkrankungen leicht an. Jedoch lässt sich dies kaum auf veränderte Umweltbedingungen zurückführen, sondern unterliegt vielmehr dem demographischen Wandel und dem medizinischen Fortschritt. Immer mehr Menschen widerfährt eine Krebserkrankung aufgrund der stetig steigenden Lebenserwartung. Es wird geschätzt, dass die Zahl der Erkrankungen bis zum Jahr 2050 um weitere 30% steigen wird.<sup>[2]</sup> Dabei sind Männer und Frauen hinsichtlich einer möglichen Erkrankung derzeit weitestgehend gleichermaßen betroffen. So wurden bei Männer im Jahr 2008 vorrangig Karzinome der Prostata (25.7%), des Darms (14.3%) und der Lunge (13.8%) diagnostiziert, während Frauen primär an Erkrankungen der Brustdrüsen (32.1%), des Darms (13.5%) und der Lunge (7%) litten. In Abb. 2.1 sind die häufigsten Tumorlokalisationen der Krebssterbefälle 2011 dargestellt.<sup>[1]</sup> Die vorliegenden Zahlen zeigen, dass Männer hauptsächlich dem Lungenkrebs erliegen, während Frauen vorrangig an Brustkrebs versterben. Betrachtet man die Anzahl der Krebssterbefälle genauer, lässt sich feststellen, dass die Zunahme der Todesfälle hauptsächlich bei den über 70-Jährigen gestiegen ist. Alle anderen Altersklassen sind kaum betroffen oder sogar rückläufig.<sup>[1]</sup>

Die häufigsten Tumorlokalisationen der Krebsverstorbenen 2011

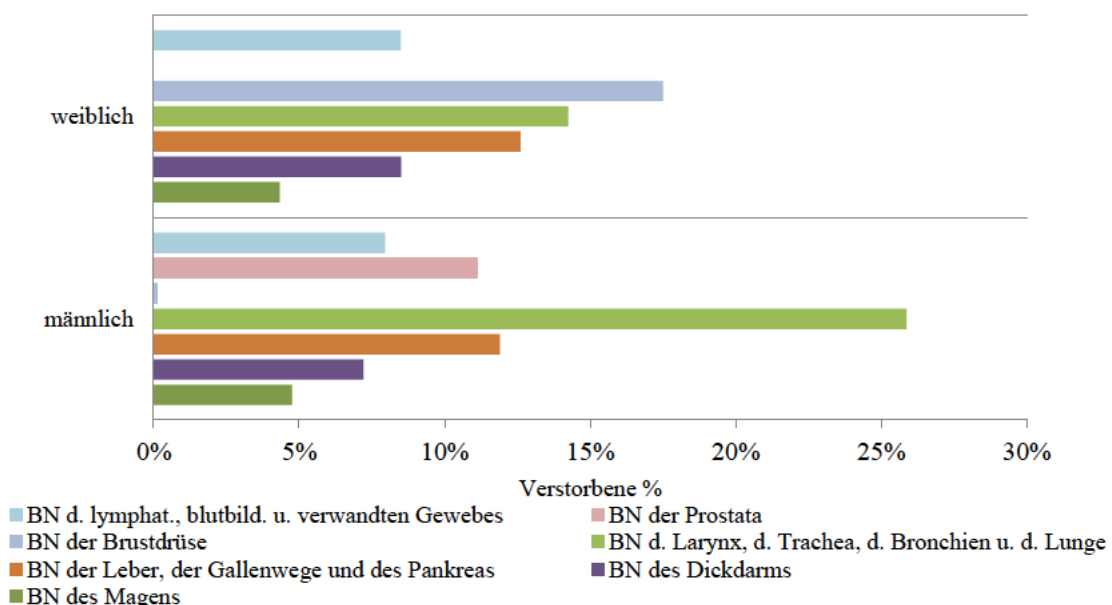


Abb. 2.1 Die häufigsten Tumorlokalisationen der Krebsverstorbenen 2011 (BN = bösartige Neubildung).

Unter dem Krankheitsbild Krebs versteht man dabei die unkontrollierte Proliferation entarteter Körperzellen. *Hanahan* und *Weinberg*<sup>[3]</sup> beschreiben hierfür sechs Merkmale auf zellulärer Ebene:

1. Das Aufrechterhalten der proliferationsfördernden Signaltransduktion.
2. Tumorsuppressorgene, um das Zellwachstum aufrecht zu halten.
3. Erhöhte Invasion in andere Zellverbände und Metastasierung.
4. Fähigkeit der unendlichen Zellteilung.
5. Das Einleiten der Angiogenese.
6. Geringe Empfindlichkeit gegenüber Apoptose einleitenden Effektoren.

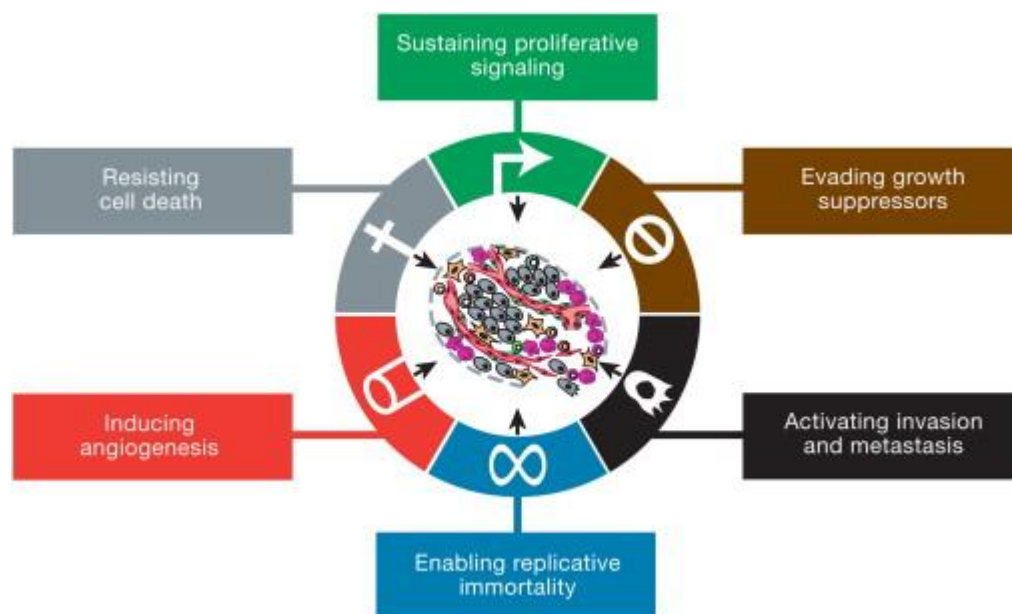


Abb. 2.2 Sechs Merkmale der Krebszelle nach Hanahan und Weinberg.

Der sonst streng regulierte Prozess der Zellteilung, welcher durch die Balance zwischen Proliferation und Apoptose bestimmt wird, gerät somit aus dem Gleichgewicht und kann zu Neoplasien führen, welche in gesundes Gewebe eindringen können. Über den Blutkreislauf können freigesetzte Krebszellen transportiert werden und an anderer Stelle zur Ausbildung von Metastasen führen. Als Ursachen der Zellentartung werden heutzutage u.a. radioaktive und UV-Strahlung, Viren, Bakterien und andere Parasiten angeführt. Ein geringer Anteil von 5-10% aller Krebserkrankungen soll auch erblich bedingt ausgelöst werden.<sup>[2]</sup> Die Therapiemöglichkeiten in der Tumorbehandlung beschränken sich derzeit auf chirurgische Eingriffe, die Strahlentherapie und reichen bis hin zur Chemotherapie, je nach Art und Stadium der Krebserkrankung. In den meisten Fällen findet eine Kombination der genannten Möglichkeiten Anwendung. So kann in einem ersten Schritt gut zugängliches Krebsgewebe operativ entfernt werden, bevor mit Bestrahlungen restliches Tumorgewebe zerstört werden kann. Eine abschließende Chemotherapie soll der Verbreitung von Metastasen entgegenwirken. Jede der genannten



Therapieformen birgt jedoch für den Patienten ein ernst zu nehmendes Risiko, zumal Strahlen- und Chemotherapie nicht selektiv sind und damit auch gesundes Gewebe deutlich in Mitleidenschaft ziehen. Der Erfolg der genannten Therapiemöglichkeiten schwankt stark je nach Krebsart, Grad der Metastasierung und einigen anderen Faktoren. Im Durchschnitt erkranken etwa 40% der Behandelten erneut oder versterben noch innerhalb der folgenden fünf Jahre.<sup>[4]</sup>

## 2.2 Mucine und aktive Krebsimmuntherapie

Fehlende effiziente Therapiemöglichkeiten für eine der häufigsten Todesursachen weltweit führten in den letzten drei Dekaden zu intensiven Forschungsbemühungen in Richtung divergenter und effizienterer Therapiemöglichkeiten. In den Blickpunkt rückten dabei neben den RAS-Proteinen<sup>[5]</sup> und Tumorstammzellen<sup>[6]</sup> auch immer mehr immuntherapeutische Ansätze,<sup>[7]</sup> die nicht nur als Prophylaxe sondern auch als akute Behandlungsmöglichkeiten dienen sollen. Einen Durchbruch bei der immuntherapeutischen Bekämpfung des Gebärmutterhalskrebses erzielte *Harald zur Hausen* mit der Entwicklung eines antiviralen Impfstoffs gegen das humane Papillomvirus. Seine Arbeit wurde 2008 mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt.<sup>[8]</sup> Mit einem solchen Krebsimpfstoff soll das Immunsystem spezifisch gegen maligne Strukturen aktiviert werden, diese im Organismus identifizieren und selektiv eliminieren. Ein weiterer Vorteil dieser Therapieform besteht in der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das einen erneuten Ausbruch der Krankheit verhindern kann.<sup>[9]</sup> Um diesen Vorsatz zu erreichen, muss eine Zielstruktur gefunden werden, die für maligne Zellen charakteristisch ist und somit ein klares Unterscheidungsmerkmal zu gesundem Gewebe darstellt. Eine mögliche Zielstruktur bei der Bekämpfung einer Vielzahl epithelialer Krebsarten wie z.B. Brustkrebs stellt das humane transmembrane Glycoprotein MUC1 dar. Dieses wird auf gesunden und malignen Zellen gleichermaßen exprimiert, unterscheidet sich aber deutlich in Häufigkeit und Glycosylierungsmuster. Dies führt zu neuen spezifischen Oberflächenstrukturen, die ausschließlich auf malignen Zellen zu finden sind und nun für das Immunsystem zugänglich werden.<sup>[10]</sup> Mucine, deren Name sich von lat. *mucus* für Schleim ableitet, stellen hochmolekulare, polymorphe Glycoproteine dar, deren Glycananteil bis zu 80% der gesamten Masse<sup>[11]</sup> erreichen kann. Diese „Schleime“ werden hauptsächlich auf der apicalen Seite<sup>[12]</sup> von Epithelgewebe exprimiert und dienen der Zelle als Schutzschild gegen Mikroorganismen, die Proteolyse oder eine erhöhte Ionen-konzentrationen.<sup>[13]</sup> Die Mucine werden dabei in zwei Klassen, zum einen in sekretorische (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 und MUC7) und zum anderen in membrangebundene Proteine (MUC1, MUC3A, MUC3B und MUC4),

unterteilt.<sup>[14-15]</sup> Das Mucin MUC1 bildet ein stabiles Heterodimer,<sup>[16-17]</sup> dessen zwei Untereinheiten von einem gemeinsamen Vorläuferprotein abgeleitet werden. Dabei ist die *N*-terminale Domäne nicht-kovalent<sup>[18]</sup> an die lipophile *C*-terminale Domäne gebunden, die in der Zellmembran nicht-kovalent verankert ist (vgl. Abb. 2.3, links). Während der *C*-Terminus in das Cytoplasma reicht und eine hohe Anzahl an potentiellen Phosphorylierungsstellen aufweist und damit eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt,<sup>[16, 19-20]</sup> reicht der *N*-Terminus des Glycoproteins in den extrazellulären Raum. Der *N*-Terminus kann ebenfalls als lösliches MUC1 im Serum nachgewiesen werden und dient daher auch als Tumormarker CA15-3 in der Krebsdiagnostik.<sup>[18, 21-22]</sup> Neben den bereits erwähnten Eigenschaften als protektive Schicht kommt dieser Domäne auch eine Bedeutung in der Zell-Zell-Adhäsion<sup>[23]</sup> zu, wodurch eine Korrelation zwischen einer Fehlsteuerung dieses Proteins mit einem unkontrollierten Zellwachstum und einer Metastasierung offensichtlich wird. Betrachtet man den Aufbau des *N*-Terminus, so besteht dieser aus repetitiven Einheiten, den sogenannten *tandem repeat units*, die sich 20- bis 100-mal wiederholen können (*variable number of tandem repeats*, *VNTR*).<sup>[24-25]</sup> Die *tandem repeat*-Sequenz ist stark konserviert und zählt im MUC1 20 Aminosäuren. Sie ist reich an den Aminosäuren Prolin, Serin und Threonin. Letztere stellen hierbei potentielle Glycosylierungsstellen<sup>[25]</sup> dar und tragen auf malignen Zellen die sogenannten tumorassoziierten Kohlenhydratantigene (*tumor associated carbohydrate antigen*, *TACA*). In Abb. 2.3 sind einige wichtige Unterscheidungsmerkmale des MUC1 schematisch dargestellt. Die rechte Abbildungsseite zeigt die unterschiedlich langen und verzweigten Glycanketten auf normalem Mucin, MUC1 (oben), während das untere Schema die stark verkürzten Kohlenhydratketten bei malignen Zellen zeigt. Das Peptidrückgrat wird nunmehr nicht länger durch das Glycangerüst maskiert, sodass nun exponierte Peptidfragmente für das Immunsystem erkennbar werden. Ein Beispiel hierfür ist in der mittleren Abbildung dargestellt. Eine als immundominante Domäne<sup>[26]</sup> bekannte Aminosäuresequenz *PDTRPAP* formt ein *turn*-Motiv,<sup>[27]</sup> das für die spezifische Anbindung von Antikörpern notwendig zu sein scheint.<sup>[26, 28-33]</sup>

Eine Überexpression des MUC1 mit stark veränderten Glycanstrukturen auf der gesamten Zelloberfläche, die wiederum auf fehlerhaften Aktivitäten, Lokalisationen und Expressionen verschiedener Glycosyltransferasen beruhen,<sup>[34-35]</sup> geht mit einem Polarisationsverlust der Zelle einher.

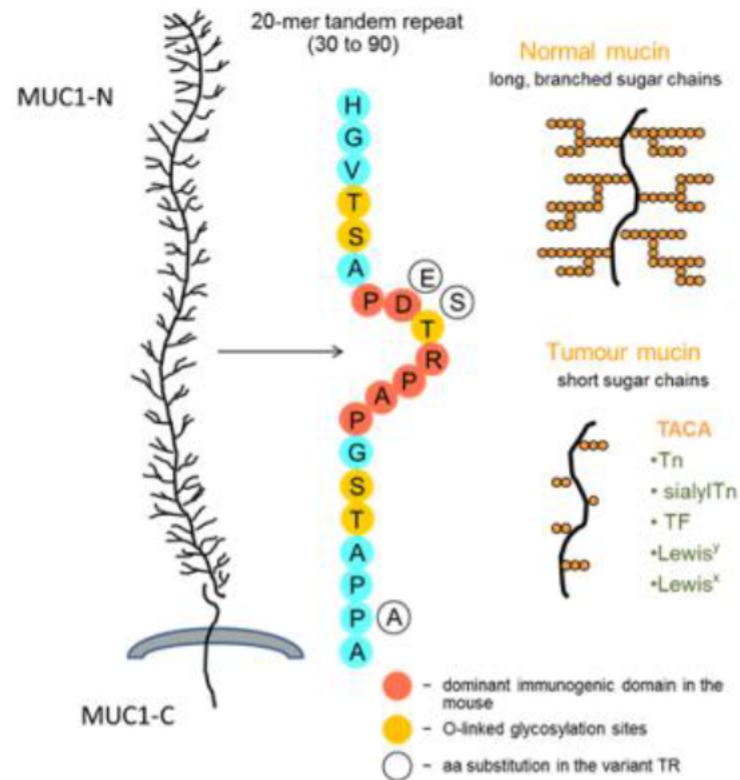


Abb. 2.3 Das Mucin MUC1, dessen tandem repeat unit und die tumor-assoziierten Kohlenhydratantigene als Unterscheidungsmerkmale.

Bei den veränderten Glycanstrukturen des MUC1, den tumorassoziierten MUC1-Kohlenhydratantigenen, handelt es sich im Wesentlichen um fünf Strukturen, nämlich das Tn- und T-Antigen sowie deren sialylierte Derivate, sTn- und sT-Antigen (vgl. Abb. 2.4).<sup>[25]</sup>

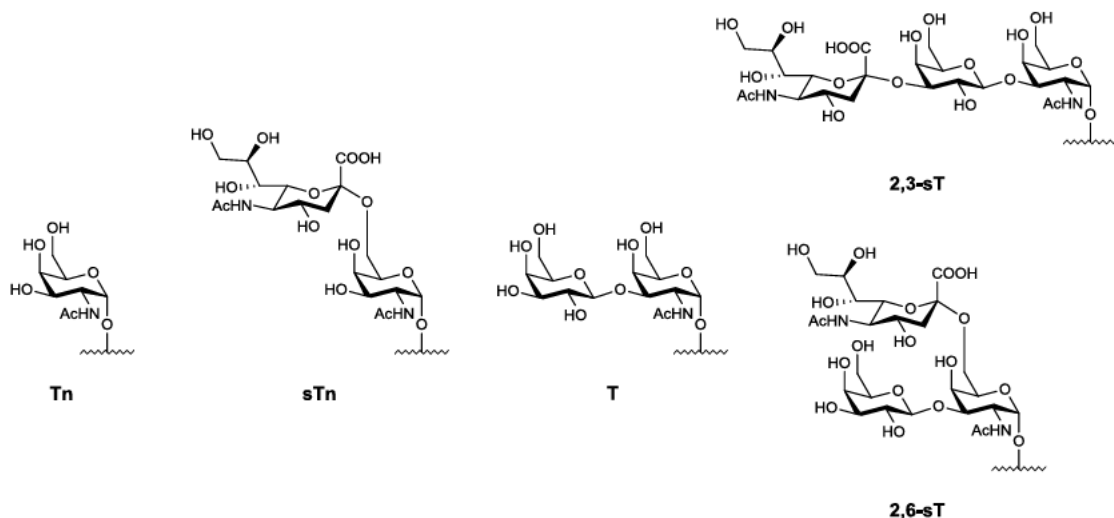
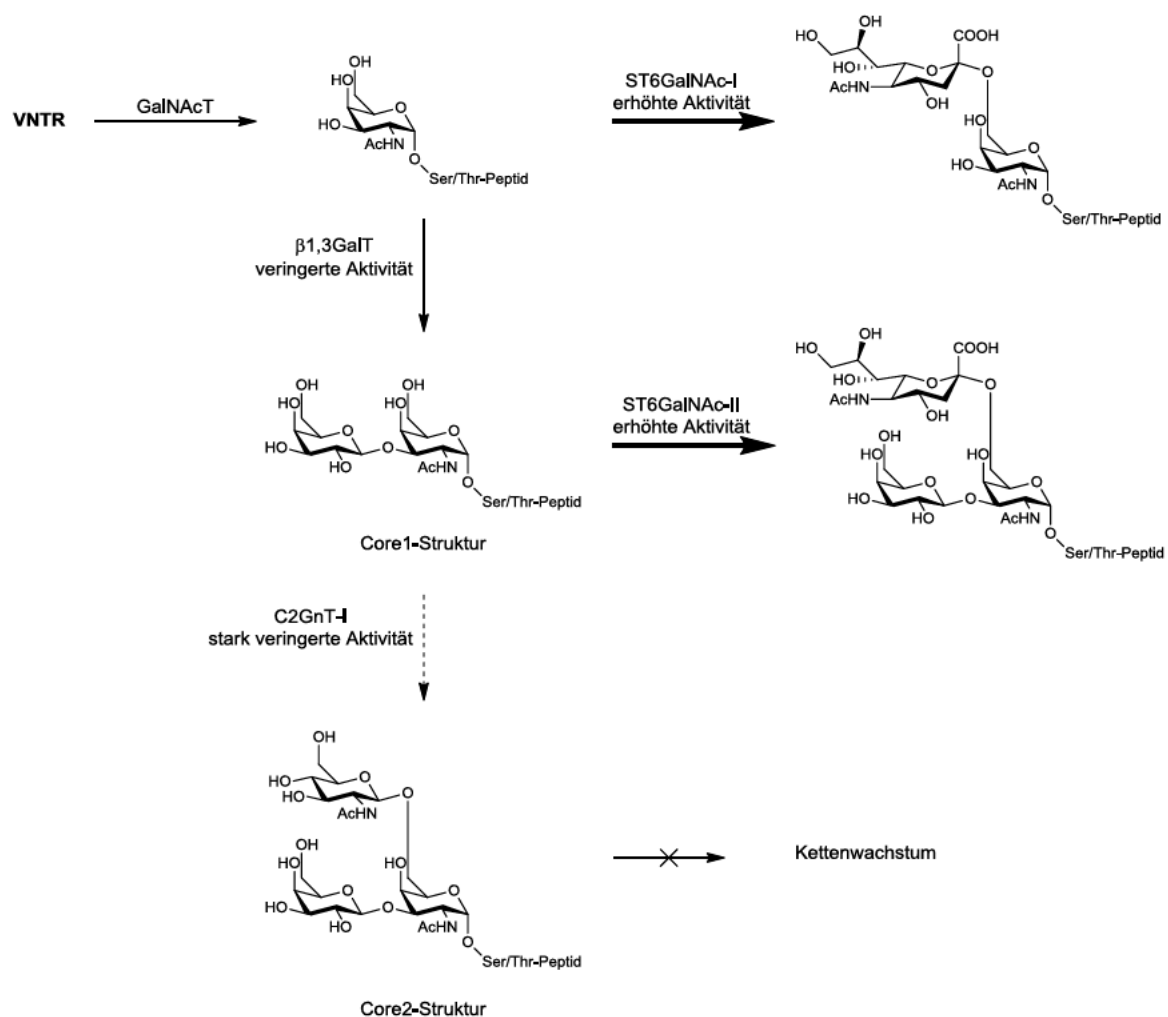


Abb. 2.4 Die für das MUC1 relevanten TACAs.

Ihr gehäuftes Auftreten lässt sich verstehen, wenn man die Biosynthese der Mucine betrachtet: Nachdem die Proteinsequenz im Ribosom aufgebaut wurde, erfolgt die posttranslationale Modifikation im Golgi-Apparat. Dabei beginnt der Aufbau der

Polysaccharidketten mit der  $\alpha$ -O-glycosidischen Anbindung eines *N*-Acetylgalactosamins (GalNAc) an einen Serin- oder Threoninrest durch eine entsprechende Transferase (GalNAcT)<sup>[36-37]</sup>. Das so entstandene Tn-Antigen wird im Folgenden durch eine  $\beta$ -1,3-Galactosylierung ( $\beta$ 1,3GalT) zur Core1-Struktur verlängert, welche wiederum als Ausgangspunkt für den Aufbau der Core2-Struktur und der komplexen Polysaccharidketten des MUC1 gesunder Epithelzellen dient. Letztendlich wird das Kettenwachstum bei gesunden Zellen durch den Einbau von Sialinsäure, Fucose oder durch Sulfatierung gestoppt.<sup>[38]</sup> Die Kombination aus einer prolinreichen Aminosäuresequenz und stark verzweigter Glycanketten führt zu einer nahezu linearen Konformation des resultierenden Glycopeptids. Zusätzlich schirmt der hohe Glycosylierungsgrad das Peptidrückgrat fast vollständig ab. In Tumorzellen dagegen findet man eine veränderte Enzymaktivität und damit auch andere Glycosylierungsmuster vor.<sup>[39-40]</sup> So zeigen die das Kettenwachstum beendenden Sialyltransferasen eine erhöhte Aktivität,<sup>[41-42]</sup> während Enzyme, die am Aufbau der komplexen Kohlenhydrate beteiligt sind, herunterreguliert werden. Dies führt zu einer frühzeitigen Terminierung der Kohlenhydratketten durch Sialinsäure, und damit zur verstärkten Ausbildung der sTn- und sT-Antigenstrukturen (vgl. Schema 2.1).



Schema 2.1 Die Biosynthese der sialylierten TACAs auf Tumorzellen.

Veränderte Glycane und neuartige antigene Determinanten auf Basis der Peptidsequenz stellen einen Ansatzpunkt für die Entwicklung effizienter Kohlenhydratvakzine dar.<sup>[43-46]</sup> Derzeit gibt es bereits eine Vielzahl monoklonaler Maus-Antikörpern, die gegen tumorassoziiertes MUC1 gerichtet sind und welche die durch veränderte Glycosylierung neu entstehenden Epitope erkennen können.<sup>[47-48]</sup> Auch eine aktive Immuntherapie auf Basis von synthetischen MUC1-Peptiden scheint vielversprechend zu sein.<sup>[47, 49-50]</sup> Das Ziel der aktiven Immuntherapie muss neben einer starken tumorspezifischen Immunantwort auch die deutliche Abschwächung immunrepressiver Mechanismen des Tumors sein, die das Immunsystem hemmen oder gar vollständig inaktivieren und so eine Eliminierung der Krebszelle unmöglich machen. Hierfür werden von *Pfitzner et al.*<sup>[51]</sup> folgende Gründe beschrieben:<sup>[52]</sup>

- Sekretion von immunsuppressiven Cytokinen durch Tumorzellen (z.B. TGF- $\beta$ , IL-10).
- Wachstum des Tumors an Orten, die dem Immunsystem nur schlecht zugänglich sind (z.B. in durch Neovaskularisation entstandenen Bereichen, die minderperfundiert sind).
- Verlust von tumorassoziierten Oberflächenantigenen (z.B. durch proteolytische Prozessierung).
- Verminderung oder Verlust der Antigenpräsentation durch Veränderung der HLA-Expression.
- Fehlende kostimulierende Moleküle auf der Tumorzelloberfläche.

Durch die Entwicklung und den Einsatz geeigneter Vakzine soll das Immunsystem stimuliert und eine humorale sowie zelluläre Immunantwort ausgelöst werden. Dabei werden folgende Forderungen<sup>[53]</sup> an das Vakzin bzw. an das Immunsystem gestellt:

1. Existenz von qualitativen oder quantitativen Unterschieden zwischen Tumorzellen und normalen Zellen.
2. Prinzipielle Fähigkeit der Erkennung solcher Unterschiede durch das Immunsystem.
3. Lernfähigkeit und Stimulierbarkeit des Immunsystems, z.B. durch aktive Immunisierung mit Vakzinen, um solche Unterschiede besser zu erkennen und effektive Tumorabstoßungsreaktionen zu bewerkstelligen.

Die Gruppe um *Kunz*<sup>[54-56]</sup> konnte einige solcher kombinierten Glycopeptid-peptid-Vakzine erfolgreich darstellen und zeigen, dass diese signifikante Antikörperreaktionen im Mausmodell erzielen. Abb. 2.5 zeigt ein 2005 veröffentlichtes Vakzin von *Dziadek et al.*<sup>[56]</sup> sowie den allgemeinen Aufbau eines solchen Vakzins. Neben den hier gezeigten Glycopeptid-Vakzinen gibt es auch Vakzine, die nur auf Kohlenhydrat- oder nur auf Peptid-Epitopen basieren. Einige dieser Vertreter wie z.B. ein sTn-KLH-Konjugat<sup>[57]</sup>

wurde bereits in der klinischen Phase III getestet, scheiterte aber 2011, weil es zu keiner nennenswerten Verbesserung der Erkrankung führte.<sup>[58]</sup> Für die Entwicklung von Glycopeptid-Vakzinen – im konkreten Fall, für das MUC1 – unterstützen NMR-Studien die These, dass sowohl Kohlenhydrat- als auch Peptidanteil für eine spezifische Bindung des Proteins notwendig zu sein scheinen. Hierzu wurde die Bindung eines 16mers (GVTSAPDTRPAPGSTA, kursiv: mögliches Tn) des MUC1 an das Antigen bindende Fragment (*Fab*) des Antikörpers B27.29 untersucht und es wurde festgestellt, dass das Kohlenhydratfragment nicht zu einer konformellen Stabilisierung des Peptids beiträgt, sondern vielmehr an einer direkten Bindung zum Antikörper antizipiert.<sup>[28, 59-60]</sup> Eine Kombination der Glycoproteine (B-Zell-Epitop) mit einem Immunstimulanz (T-Zell-Epitop), das gleichzeitig als Trägerprotein fungiert, scheint für die Entwicklung eines potenziellen Vakzins günstig zu sein, um die Immuntoleranz gegenüber körpereigener Strukturen zu überwinden. Hierzu werden i.d.R. die Vakzinkandidaten über einen nicht-immunogenen Linker an das Trägerprotein gekoppelt. Als Carrierproteine dienen in der Literatur *Tetanus Toxoid* (TTox),<sup>[61-62]</sup> *Bovines Serum Albumin* (BSA)<sup>[63-67]</sup> oder *keyhole limpet hemocyanin* (KLH),<sup>[68-69]</sup> oder es handelt sich um ein T-Zell Epitop wie z.B. eine Teilsequenz des *Ovalbumins* (OVA)<sup>[55]</sup> oder des VP1 Proteins des Poliovirus Typus 1.<sup>[70]</sup> In Abb. 2.5 ist ein solches Vakzin schematisch dargestellt.

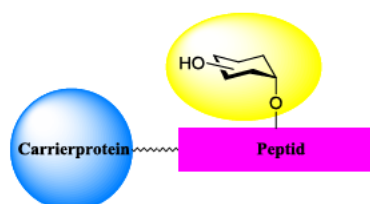
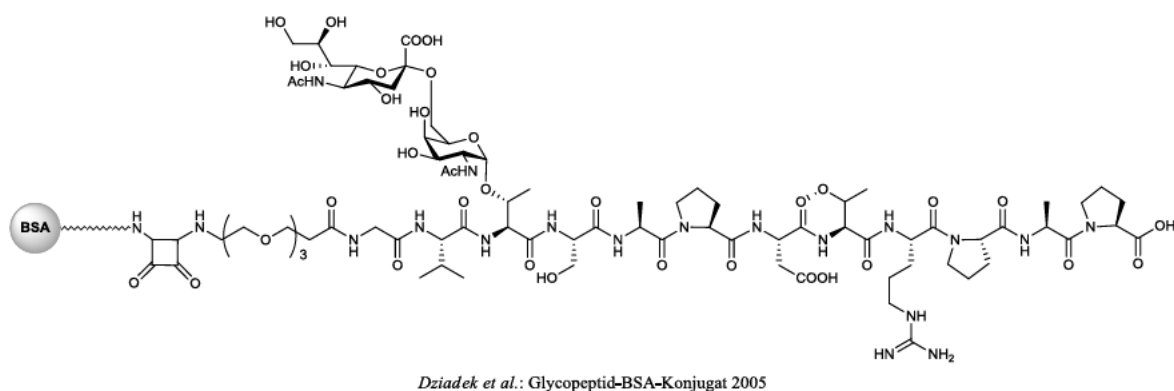


Abb. 2.5 Glycopeptid-Vakzin aus der Gruppe Kunz und schematischer Aufbau des gezeigten Glycopeptid-Vakzins.

Anhand der Abb. 2.6 soll nachfolgend die Immunreaktion schematisch gezeigt werden. B-Zellen tragen auf ihrer Zelloberfläche Immunglobuline als Antigenrezeptoren (B-Zell-Rezeptoren, BCR) und setzen nach ihrer Aktivierung und Differenzierung diese als lösliche Antikörper im extrazellulären Raum frei (humorale Antwort). T-Zellen dagegen



erkennen i.d.R. über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) Peptidfragmente intrazellulärer Pathogene oder in diesem Fall die maligne MUC1-Teilsequenz, die über einen Haupthistokompatibilitäts-Komplex (major histocompatibility complex, MHC) präsentiert wird. Dabei bestimmen der Typ von prozessiertem Peptid und MHC-Komplex die fortschreitende Immunantwort. MHC-I-Komplexe aktivieren cytotoxische T-Zellen, während  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen auf MHC-II-Komplexe spezialisiert sind und die B-Zelle mit Cytokinen und anderen costimulierenden Faktoren zur Ausschüttung von Immunglobulinen aktivieren, welche wiederum für die Bekämpfung von malignen Zellen notwendig sind. T-Zellen spielen also sowohl für die humorale als auch für die zelluläre Immunantwort eine entscheidende Rolle.<sup>[71]</sup>

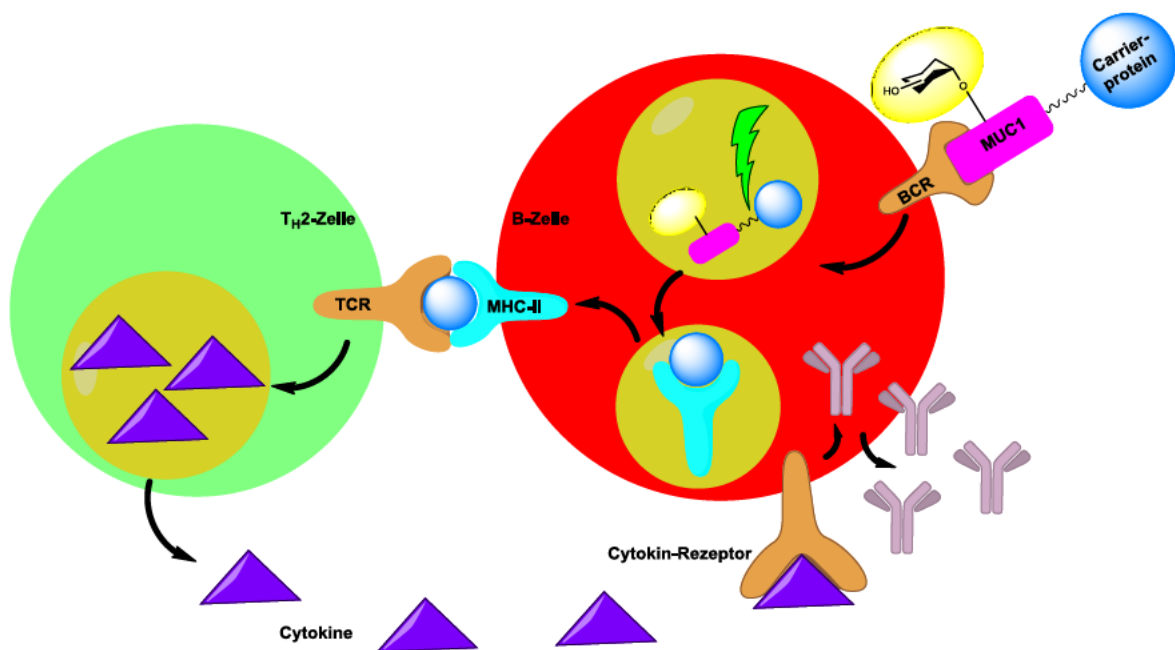


Abb. 2.6 Schematische Darstellung der Costimulation zwischen B- und T-Zellen.

## 2.3 Modifikationsmöglichkeiten in der MUC1-Struktur

Modifikationen der MUC1-Struktur können eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Krebsvakzinen spielen. Von der Einführung von Modifikationen erwartet man eine verbesserte Immunogenität und eine längere Bioverfügbarkeit der synthetisierten Vakzine. Hierfür bieten sich zwei Überlegungen an: Zum einen kann der Glycananteil von verschiedenen Glycosidasen hydrolysiert werden, andererseits besteht die Gefahr, dass die synthetisierten Glycopeptide durch Endo- und Exopeptidasen abgebaut werden. In beiden Fällen gehen durch den enzymatischen Verdau Informationen für das Immunsystem verloren und beeinträchtigen somit die Immunantwort. In diesem Kapitel sollen einige Möglichkeiten vorgestellt werden, welche die Glycanseitenkette oder das Peptidrückgrat

stabilisieren können. Diese Methoden finden nicht ausschließlich bei MUC1-Strukturen Anwendung, sondern sind vielmehr synthetische Modifikationsmöglichkeiten, die bei einer Vielzahl von Verbindungsklassen Anwendung fanden und finden. Einige Beispiele werden nachfolgend an entsprechender Stelle aufgeführt.

### 2.3.1 Modifikationenmöglichkeiten der Glycanseitenkette

Eine Möglichkeit die Glycanseitenkette gegen den enzymatischen Abbau zu stabilisieren, besteht darin, den Acetalcharakter des C1-Atoms zu verändern. Aus der Literatur sind S-Glycoside, C-Glycoside<sup>[72-73]</sup> und Carbazucker<sup>[74]</sup> (letztere generieren einen endo- bzw. exo-Ether) bekannt.<sup>[75]</sup> S-Glycoside wurden bereits in einer Vielzahl von Strukturen<sup>[76]</sup> verwendet. Hierzu zählen vor allem Thio-Oligosaccharide aber auch einige Glycopeptidstrukturen. So konnte z.B. die Peptidsequenz Ala<sup>484</sup>-Ala<sup>490</sup> des Tamm-Horsfall-Proteins **I** als Thioglycosid dargestellt werden (vgl. Abb. 2.7).<sup>[77]</sup> S-Glycoside sind synthetisch leicht zugänglich<sup>[78]</sup> und zeigen sowohl in Lösung als auch an Peptide koordiniert vergleichbare Konformationen zu den O-Glycosiden.<sup>[79-81]</sup> Gleichzeitig überzeugen sie durch ihre niedrigere Anfälligkeit gegenüber enzymatischer<sup>[82]</sup> und Säure katalysierter Hydrolyse. So konnten die Gruppen um Bousquet<sup>[83]</sup> und Galonić<sup>[84]</sup> Thioglycosidkonjugate der MUC1-Struktur synthetisieren. Hierbei wurde im Mausmodell gezeigt, dass Verbindung **II** (Galonić *et al.*) als Tetanus Toxoid-Konjugat zu einer starken Antikörperreaktion führte. Die aus Serum isolierten Antikörper erkannten das entsprechende O-Glycosid noch in hoher Verdünnung. Bundle *et al.*<sup>[85-87]</sup> zeigten, dass Thioglycosid **III**, ein Analogon des Gangliosidglycolipids GM<sub>3</sub>, zu guten immunologischen Ergebnissen führen kann (vgl. Abb. 2.7). Hierfür wurden BALB/C-Mäuse mit einem Tetanus-Toxoid-Konjugat des Thioglycosids **III** geimpft. Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass durch das Thioglycosid eine höhere antigenspezifische Immunantwort ausgelöst wurde, sondern auch, dass entsprechende polyklonale Antikörper die native Oligosaccharidstruktur erkennen können.



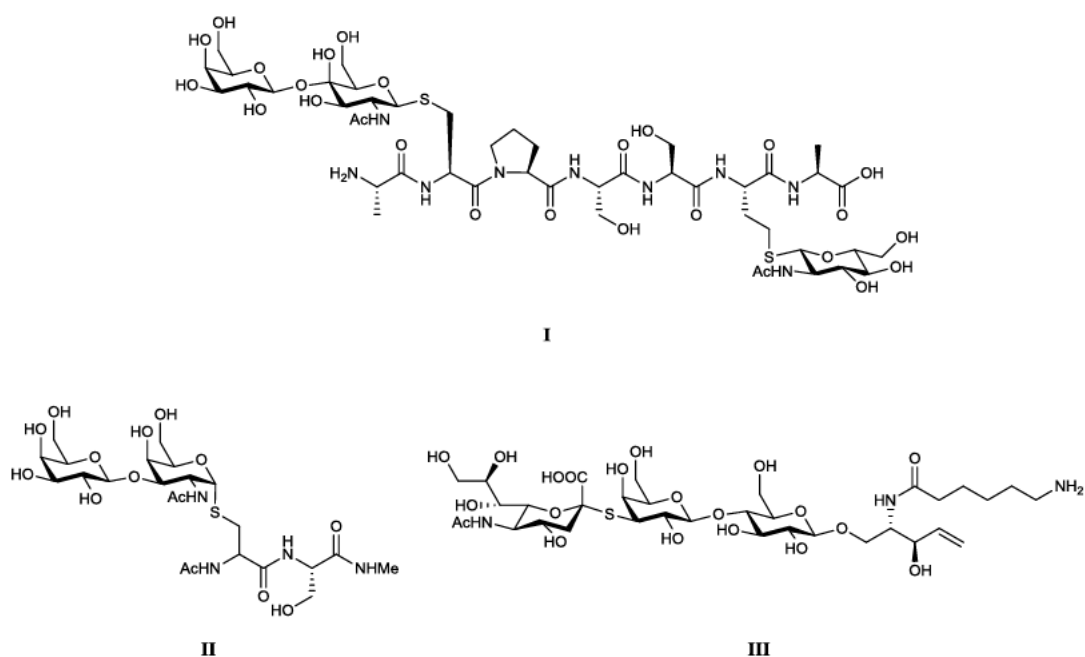


Abb. 2.7 S-Glycosidanaloga des Tamm-Horsfall-Proteins **I** und des T-Antigens **II**. Struktur **III** zeigt ein Strukturmerkmal des GM<sub>3</sub> Gangliosidglycopeptids als Thiolglycosid.

Die formale Substitution der O-glycosidischen Bindung durch eine Methylengruppe führt zu C-Glycosiden. Ihre Darstellung kann ausgehend von (Semi)Aldehyden durch *Wittig*- oder *Henry*-Reaktion mit anschließender exo- oder endo-Zyklisierung, durch eine Umpolung<sup>[88-89]</sup> des anomeren Zentrums (z.B. in einer Barbier-Typ ähnlichen Kondensation) oder durch die homo- oder heterolytische Bindungsspaltung von Glycosylhalogeniden erfolgen, um nur einige Methoden zu nennen. Dabei stellt die Synthese der C-C-Bindung in Gegenwart der polyfunktionalen Zucker und deren Schutzgruppenchemie eine besondere Herausforderung dar, besonders wenn die methylenverbrückten Saccharide stereokontrolliert aufgebaut werden sollen.<sup>[73]</sup> *Jimenez-Barbero et al.* konnten zudem zeigen, dass C-Glycoside eine größere Konformationsflexibilität aufweisen, was sie auf den fehlenden exo-anomeren Effekt zurückführen.<sup>[79, 90-94]</sup> In der Vergangenheit konnten einige der oben genannten Antigene C-glycosidisch verknüpft werden. So erarbeiteten *Beau*<sup>[95]</sup> und Mitarbeiter 1998 eine Synthese für die Darstellung eines Tn-Analogons **IV**. Im Jahre 2003 folgten Arbeiten zum sTn-Analogon<sup>[96]</sup> **V** (vgl. Abb. 2.8). Die Gruppe um *Vogel*<sup>[97]</sup> konnte zeigen, dass mit derartigen Modifikationen ein methylenverbrücktes Disaccharidanalogon des T-Antigens dargestellt werden kann. Letzteres zeigte als Tripeptidcluster **VI** in einem KLH-Konjugat in ersten Vakzinierungsversuchen vielversprechende Ergebnisse.

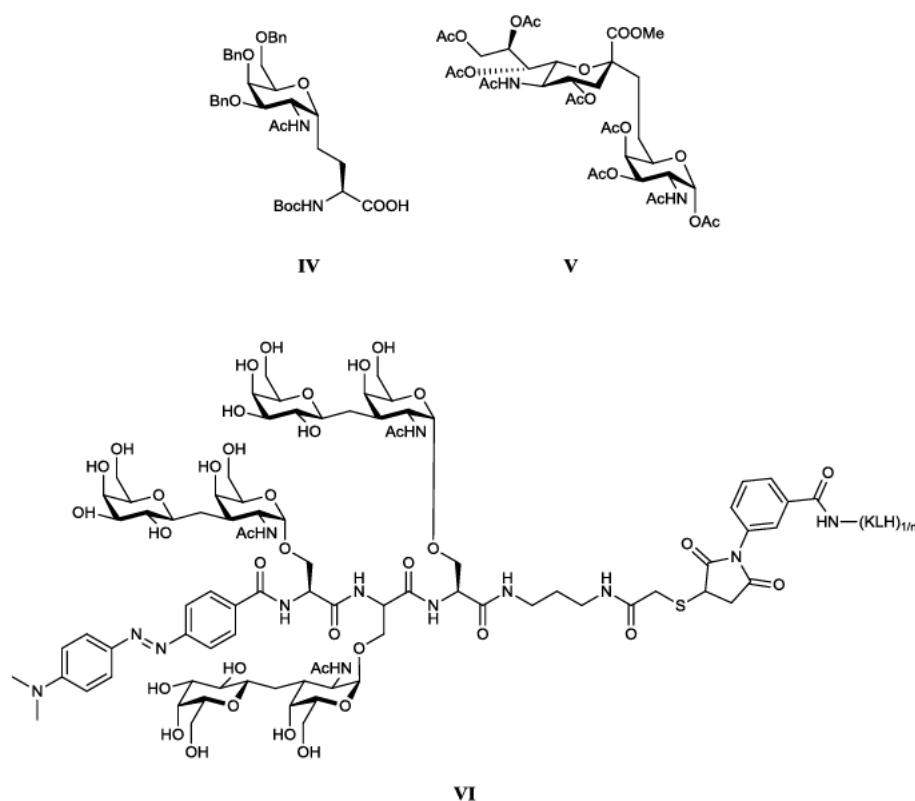


Abb. 2.8 Die C-Glycoside des Tn- und des sTn-Antigens (IV und V) bzw. des T-Antigens als KLH-Konjugat VI.

Carbazucker<sup>[74]</sup> stellen synthetisch eine der größten Herausforderungen dar. Der formale Ersatz des Ringsauerstoffs durch eine Methylengruppe führt wie bei den C-Glycosiden zu einer Etherbindung an C1. Damit einher geht der Verlust des konformativ und stereochemisch wirksamen anomeren Effekts, wodurch ebenfalls der häufig genutzte Nachbargruppen-effekt der Schutzgruppen in 2-Position für die Verknüpfung zu anderen Sacchariden verloren geht. Daher verwundert es nicht, dass zwar eine Vielzahl an Syntheseverarianten für den Aufbau der Pseudomonosaccharide bestehen, jedoch wurde diese Substanzklasse hinsichtlich ihrer Eignung als carbaanaloger TACAs kaum untersucht. Abb. 2.9 zeigt zwei Beispiele für Carbazucker: Struktur VII zeigt eine Partialstruktur des sialyl-LeX und Struktur VIII zeigt den derzeit wohl bekanntesten Vertreter, den Neuroamidasehemmer Oseltmivir<sup>[74, 98]</sup> (Tamiflu®).

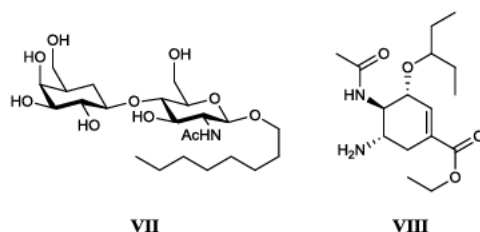


Abb. 2.9 Das Disaccharid des sialyl-LeX VII und Oseltmivir VIII.

Eine weitere Möglichkeit die Glycanseitenkette zu modifizieren, besteht in der Substitution einzelner Hydroxylgruppen gegen Fluor. Dabei wird kein direkter Einfluss auf die glycosidische Bindung genommen. Vielmehr eignet sich Fluor als Hydroxylgruppenersatz aus zwei Gründen: Zum einen ist die Elektronegativität ähnlich hoch und zum anderen ist der *van der Waals*-Radius des Fluors nur unwesentlich kleiner als der von Sauerstoff.<sup>[99]</sup> Die Substitution von Hydroxylgruppen an Zuckern stellt eine etablierte Methode dar, um spezifische Zucker-Protein Wechselwirkungen zu studieren.<sup>[100]</sup> Fluor ist aber auch aus immunologischer Sicht interessant, da durch dessen Einbau die biologische Halbwertszeit sowie die Immunogenität von künstlichen Vakzinen erhöht werden kann. Unter anderem konnte das an den Positionen 6 und 6' fluorierte T-Antigenanalogon in dem in Abb. 2.10 gezeigten Vakzin **IX** bereits mit gutem Erfolg auf dessen Immunogenität in der MUC1 Sequenz getestet werden (Abb. 2.10).<sup>[54]</sup>

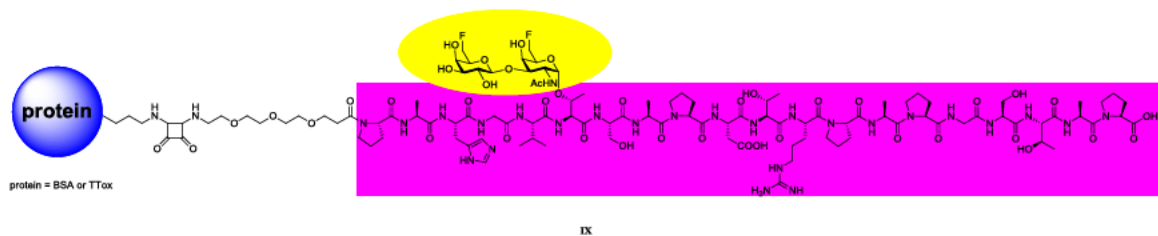


Abb. 2.10 Ein Vakzin aus der Gruppe Hoffmann-Röder mit fluorierten Kohlenhydratresten.

### 2.3.2 Modifikation des Peptidrückgrats

Für die Modifizierung des Peptidrückgrats gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten. Diese reichen von methylierten Peptidbindungen<sup>[101]</sup> und fluorierten Aminosäuren<sup>[102-103]</sup> über verschiedene  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aminosäuren<sup>[104-105]</sup> und deren Peptide („Foldamere“)<sup>[106]</sup> bis hin zum Verschieben der Aminosäureseitenketten auf eine Aminogruppe (Peptoide, *N*-Acyl-*N*-Aminoethyl-Peptide u.ä.)<sup>[107-109]</sup> (vgl. Abb. 2.11). Viele dieser Verbindungsklassen zeigen übergeordnete Strukturen. Allerdings ist nur wenig über Strukturänderungen und deren Ursachen in Hybridpeptiden bekannt. Die folgenden Abschnitte stellen einige Verbindungsklassen genauer vor.

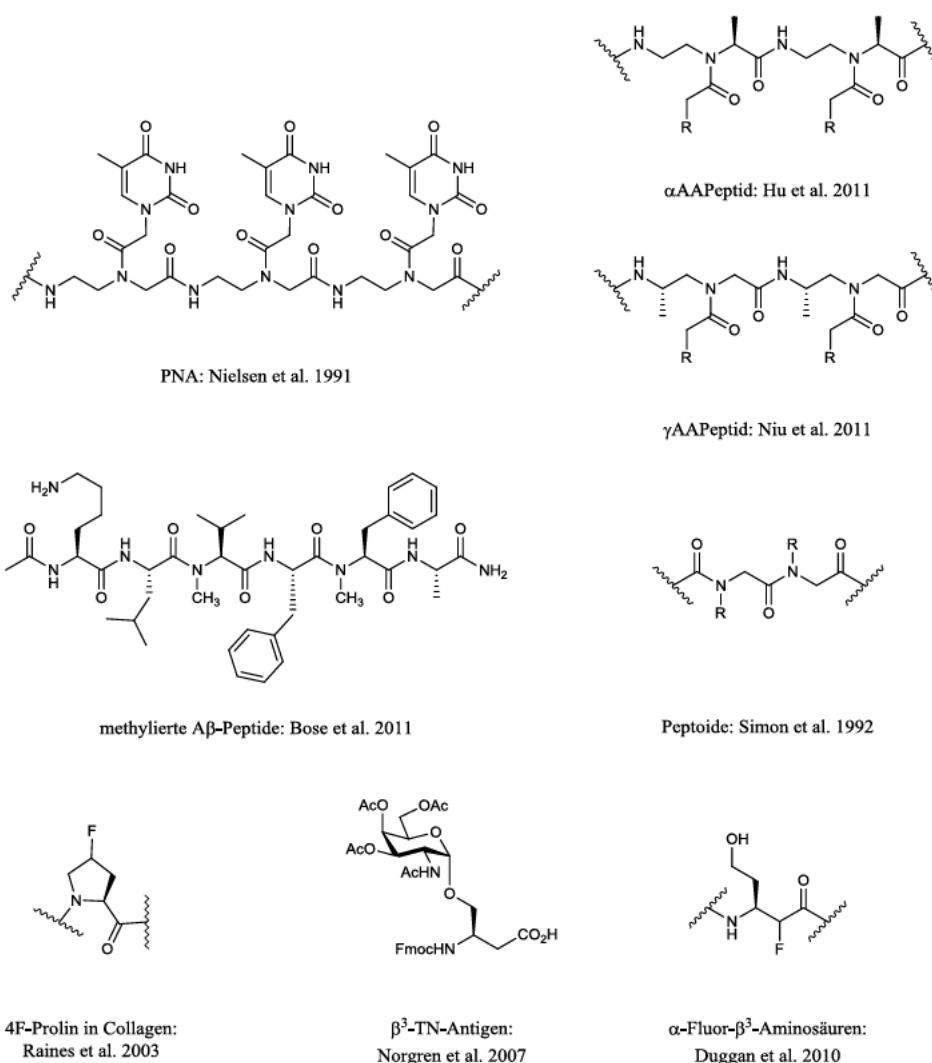
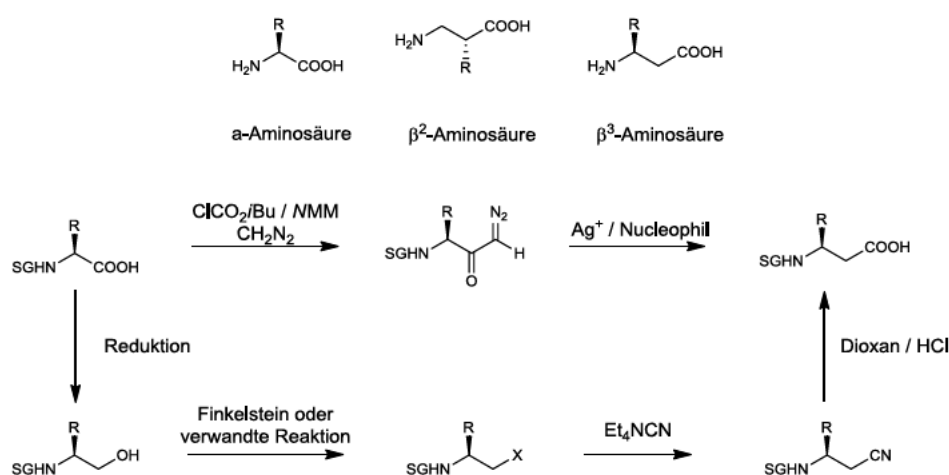


Abb. 2.11 Übersicht über gängige Peptidrückgrat-Modifikationen.

### 2.3.3 $\beta$ -Aminosäuren<sup>[52]</sup>

Man unterscheidet nach *Seebach und Mitarbeitern*<sup>[46, 110]</sup>  $\beta^2$ - und  $\beta^3$ -Aminosäuren, je nachdem welches C-Atom die Seitenkette trägt. Während die diastereoselektive Synthese<sup>[111]</sup> von  $\beta^2$ -Aminosäuren noch immer eine Herausforderung<sup>[112-113]</sup> darstellt, sind  $\beta^3$ -Aminosäuren dagegen kommerziell erhältlich und auch synthetisch durch *Arndt-Eistert*-<sup>[114]</sup> oder *Kolbe-Homologisierung*<sup>[115-116]</sup> gut darstellbar (vgl. Schema 2.2, für weitere Darstellungsmethoden siehe *Seebach et al.*<sup>[104]</sup>).



Schema 2.2 Benennung der Aminosäuren und im Labor gängige Methoden zur Darstellung von  $\beta^3$ -Aminosäuren.

Im Gegensatz zu den proteinogenen  $\alpha$ -Aminosäuren sind die meisten  $\beta$ -Aminosäuren nur in bestimmten Naturstoffen enthalten.<sup>[117]</sup> So nutzen z.B. Mikroorganismen aber auch Pilze und höhere Pflanzen  $\beta$ -Aminosäuren als Bestandteil ihrer Sekundärmetabolite im Überlebenskampf mit anderen Organismen. Als Folge dessen zeigen diese Substanzen häufig biologische und physiologische Eigenschaften, die auf die Struktur der  $\beta$ -Aminosäuren zurückzuführen sind. Letzteres macht nicht nur eine ganze Reihe von Naturstoffen als potenzielle Leitstrukturen interessant, sondern auch die  $\beta$ -Aminosäuren als molekulare Werkzeuge. Obwohl  $\beta$ -Aminosäuren – wenn auch relativ selten<sup>[111, 118]</sup> – in der Natur vorkommen, werden sie i.d.R. von menschlichen Peptidasen nicht erkannt, was zu einer erhöhten metabolischen Stabilität<sup>[105, 119-120]</sup> solcher Hybridpeptide führt. Ferner zeigen  $\beta$ -Peptide eine Reihe interessanter Strukturen,<sup>[121-122]</sup> während einzelne Substitutionen kaum zu einer Konformationsänderung des Hybridpeptids gegenüber dem  $\alpha$ -Peptid führen, wodurch häufig die biologische Aktivität erhalten bleibt.<sup>[105]</sup> Sie stabilisieren eine Vielzahl von Strukturmerkmalen,<sup>[105, 119]</sup> zeigen gegenüber Enzymen eine erhöhte Resistenz, während sie die funktionellen Seitenketten in der gewünschten



relativen Konfiguration beibehalten. So zeigten z.B. *Aguilar et al.*<sup>[105]</sup>, dass der gezielte Einbau von  $\beta$ -Aminosäuren in die immundominante Domäne des Hühner-Ovalbumins nicht nur zu einer verbesserten Stabilität gegenüber einer Vielzahl von Enzymen, sondern auch zu einer starken Immunantwort in ersten Vakzinierungsversuchen führte. In Abb. 2.12 sind die immundominanten T-Zellepitope SIINFEKL **X** bzw. das „Betatope“ SIIN( $\beta$ F)EKL **XI** des Hühner-Ovalbumins als Sequenz und die Kristallstruktur des an den MHC1-Komplex H-2K gebundenen (Hybrid)Peptids gezeigt. Letzteres lässt erkennen, dass die Konformation des Peptids durch die Substitution des Phe<sup>5</sup> gegen  $\beta^3$ -Phe<sup>5</sup> kaum beeinträchtigt wird. Dennoch steigt die Stabilität gegenüber Blutserum und einigen ausgewählten Enzymen (vgl. Abb. 2.12<sup>[105]</sup>).

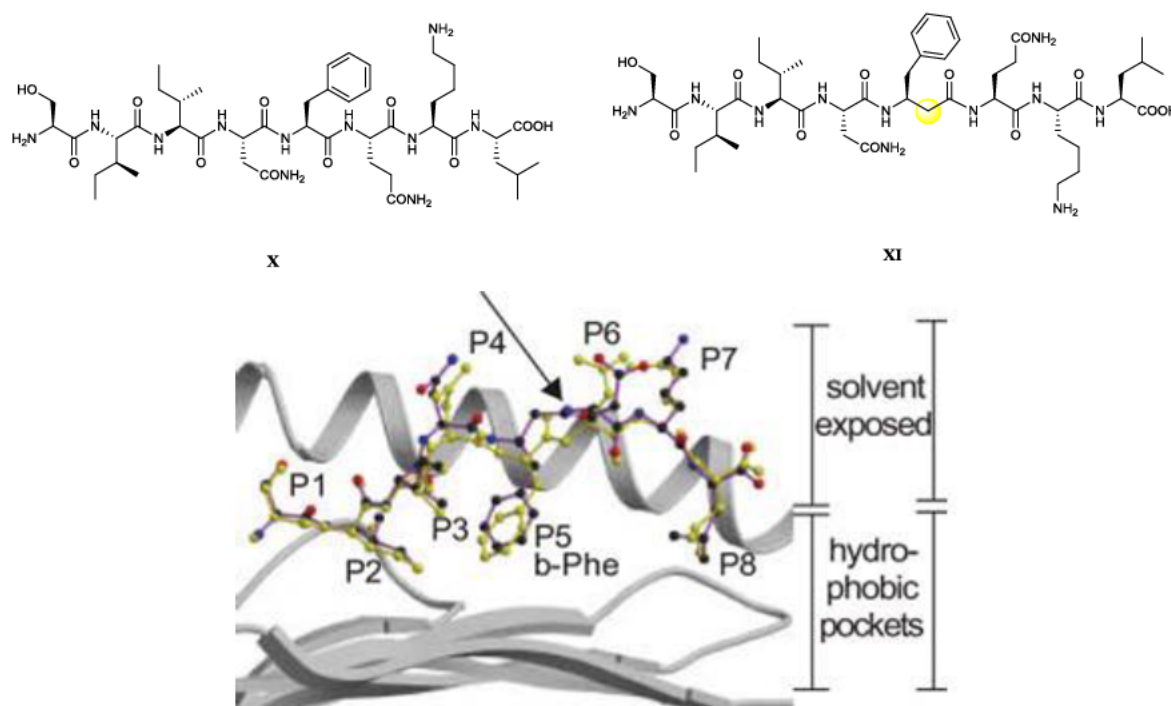


Table 3 Proteolytic degradation of SIINFEKL and SIIN( $\beta$ -F)EKL

Entry	Peptide	% Degradation by proteases			
		Serum <sup>a</sup>	Pronase <sup>b</sup>	PK <sup>b</sup>	Pepsin <sup>b</sup>
1		95	>85	75	75
2	"Wild type" antigen surrogate 	70	<50	0	0

<sup>a</sup> After 2 h. <sup>b</sup> After 6 h. = L- $\alpha$ -amino acid, = L-C $\beta$ -amino acid.

Abb. 2.12 Die immundominanten T-Zellepitope **X** (gelb) und **XI** (blau) im Vergleich gebunden an den MHC1-Komplex H-2K<sup>b</sup> (Kristallstruktur). Der Pfeil deutet auf den Einbau des  $\beta^3$ -Phe hin. Die Tabelle unten zeigt die metabolische Stabilität gegenüber Serum und einigen ausgewählten Proteasen.

Weiterhin konnten in den vergangenen Jahren einige Glycosylaminosäuren aufgebaut werden. So synthetisierten die Gruppen um *Norgren et al.*<sup>[123-124]</sup> und *Hoffmann-Röder*<sup>[52, 125]</sup> erste Vertreter der zuvor genannten Tn- bzw. T-Antigenanaloga auf Basis des  $\beta^3$ -homo-Serins **XII** und des  $\beta^3$ -homo-Threonins **XIII-XV** (Abb. 2.13). Von der Gruppe um *Hoffmann-Röder* konnte in diesem Zusammenhang ein erstes  $\alpha/\beta$ -Hybridpeptid mit einem Tn-Analogon auf Basis von  $\beta^3$ -homo-Threonin **XIII** dargestellt werden.

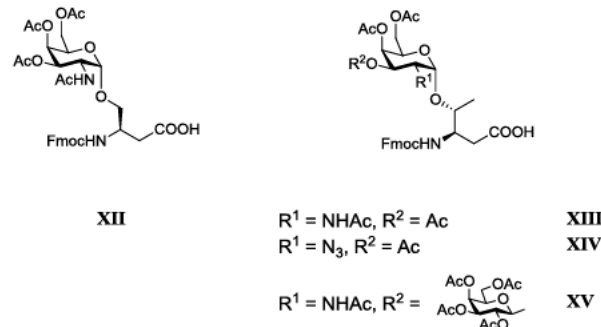


Abb. 2.13 Die von den Gruppen *Norgren* und *Hoffmann-Röder* dargestellten Tn-Antigenanaloga.

Eine mögliche Erklärung der Stabilität gegenüber Peptidasen ist die Tatsache, dass durch den Einbau einer zusätzlichen Methyleneinheit, die zu spaltende Peptidbindung aus dem aktiven Enzymzentrum verdrängt wird, wie es in Abb. 2.14 schematisch für eine Zinkprotease gezeigt ist.<sup>[126]</sup>

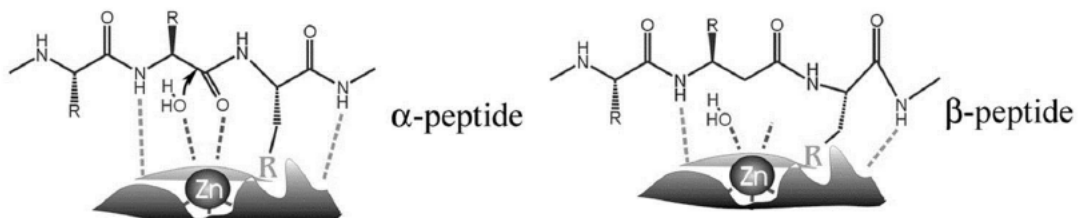


Abb. 2.14 Koordination und Hydrolyse von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptiden in einer Zinkprotease.

*Hook et al.*<sup>[127]</sup> untersuchten eine weitere Erklärungsmöglichkeit: Der nun zwei Kohlenstoffatome entfernte Stickstoff des Peptidrückgrats könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Reaktivität der Amid-Carbonylgruppe haben. Der Einbau von elektronenziehenden Gruppen wie Fluor- oder Hydroxylsubstituenten in der  $\alpha$ -Position sollte diesen Verlust minimieren und wieder zu einer geringeren Stabilität gegenüber verschiedenen Peptidasen führen, was sich allerdings nicht bestätigte. Fluorierte  $\beta$ -Aminosäuren bieten, über die Steigerung der metabolische Stabilität hinaus, eine Vielzahl von Eigenschaften wie z.B. eine erhöhte Lipophilie, gezielte Manipulation der Konformation,<sup>[128]</sup> inhibitorische

Eigenschaften<sup>[129]</sup> und die Möglichkeit als Marker in Bindungsstudien eingesetzt zu werden.<sup>[100]</sup>

Anlässlich der mehr als 100 Jahren anhaltenden Geschichte der *Wolff*-Umlagerung und der damit verbundenen *Arndt-Eistert*-Reaktion bieten einige Reviews einen ersten guten Überblick über die Möglichkeiten und Grenzen der Diazocarbonylchemie.<sup>[128, 130-131]</sup>

### 2.3.4 Peptoide und *N*-Acyl-*N*-Aminoethyl-Peptide (AA-Peptide)

Weitere Möglichkeiten der Peptidmodifikation bestehen in der Synthese von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptoiden,<sup>[132]</sup> deren Hybride<sup>[133]</sup> mit einem  $\alpha$ -Peptid bzw. von  $\alpha$ -*N*-Acyl-*N*-aminoethyl- und  $\gamma$ -*N*-Acyl-*N*-aminoethyl-Peptiden<sup>[134-135]</sup>. Zu letzterer Gruppe zählen ebenfalls die PNAs (**p**eptide **n**ucleic **a**cids), die bereits in diversen Assays eine höhere metabolische Stabilität gegenüber Nucleasen und Proteasen sowie eine höhere Affinität zu DNA zeigten.<sup>[109, 136]</sup>

*Zuckermann et al.*<sup>[107, 137]</sup> prägten Anfang der 1990er den Begriff der *N*-Substituierten Glycin Oligomere ( $\alpha$ -Peptoide). Als *small molecule*-Leitstrukturen der pharmazeutischen Industrie,<sup>[138]</sup> wo sie bevorzugt als Trimere eingesetzt wurden, entwickelten sie sich mehr und mehr zu oligomeren Sonden, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen.<sup>[107, 137-138]</sup> Im Vergleich zu  $\alpha$ -Peptiden zeigen  $\alpha$ -Peptoide ebenfalls übergeordnete Sekundärstrukturen, die aufgrund sterischer und elektronischer Wechselwirkungen gebildet werden, woraus sich auch ableiten lässt, dass Wasserstoffbrückenbindungen nicht den entscheidenden Anteil zu der Ausbildung übergeordneter Strukturen beitragen müssen.<sup>[139]</sup> Darüberhinaus bleiben diese Strukturelemente über einen weiten Bereich verschiedener Lösungsmittel sowie ionischer und thermischer Bedingungen erhalten. Da es sich durch die Verschiebung einer „Aminosäureseitenkette“ auf den Glycinstickstoff nicht mehr um ein klassisches Peptidrückgrat handelt, zeigt letzteres eine erhöhte metabolische Stabilität gegenüber diversen Proteasen. Mit der Ausbildung des tertiären Amins erhöht sich ebenfalls die Lipophilie des Rückgrats, wodurch die Membranpermeabilität solcher Peptidmimetika erhöht wird und diese leichter einzelne Zellen penetrieren können. Die Synthesemöglichkeiten für  $\alpha$ -Peptoide erstrecken sich von der Lösungsmittelchemie bis hin zur SPPS durch Mikrowellenunterstützung.<sup>[140-141]</sup> Dabei bietet nicht nur das



Pseudopeptidrückgrat sondern auch die Seitenkette eine Vielzahl an Variationsmöglichkeiten (Aromaten, Alkyle, Alkohole, Ether, Kohlenhydrate etc.). Im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Peptoiden sind für  $\beta$ -Peptoide verhältnismäßig wenige Informationen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen bekannt. Die Synthese kann ebenfalls an fester Phase durchgeführt werden, allerdings wurde gezeigt, dass die Synthese von Pentameren und größeren Einheiten zu Problemen führen kann, vor allem, wenn sterisch gehinderte Amine eingesetzt werden.<sup>[133]</sup> Aus diesem Grund werden für Peptoid-Peptid-Hybride vermehrt  $\alpha$ -Peptoidbausteine eingesetzt. So konnten *Goodman* und Mitarbeiter mit Peptoid-Peptid-Hybriden die Collagen-Triple-Helix simulieren.<sup>[142-149]</sup> Die Modifikation von Peptiden durch Peptoidbausteine verbessert in vielen Fällen die Eigenschaften von biologisch aktiven Verbindungen. So zeigten *Stawikowski et al.*,<sup>[150]</sup> dass die Verwendung von *N*-Benzyl-glycin in Position 12 zu einer 100-fach stärkeren Inhibition des bovinen  $\alpha$ -Chymotrypsins führt als ein vergleichbares  $\alpha$ -Peptid. Das Peptoid-Hybridpeptid ist Abb. 2.15 gezeigt.

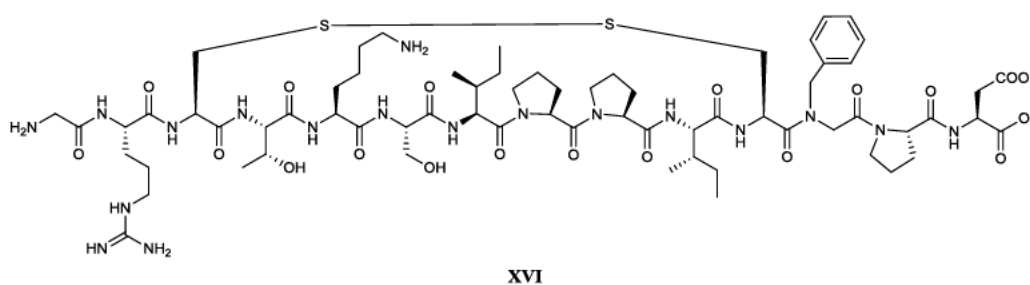


Abb. 2.15 Peptoid-Hybridpeptid als Inhibitor des bovinen  $\alpha$ -Chymotrypsins

Ein anderes Anwendungsbeispiel ist in der Modifikation des Wirkstoffs Octreotide Acetat (Sandostatin<sup>®</sup>, 337 Mrd USD/a) **XVII** zu finden. Sandostatin<sup>®</sup> **XVII** wird zur Regelung des Wachstumshormons und auch zur Linderung bestimmter Beschwerden, die auf Geschwulste des Magen-Darm-Traktes zurückzuführen sind, eingesetzt. Es reguliert gleichzeitig die Ausschüttung des Wachstumshormons sowie von Insulin. Das Mimetikum **XVIII** (vgl. Abb. 2.16) dagegen reguliert ausschließlich die Ausschüttung des Wachstumshormons und eröffnet so neue Therapiemöglichkeiten.<sup>[151-152]</sup>

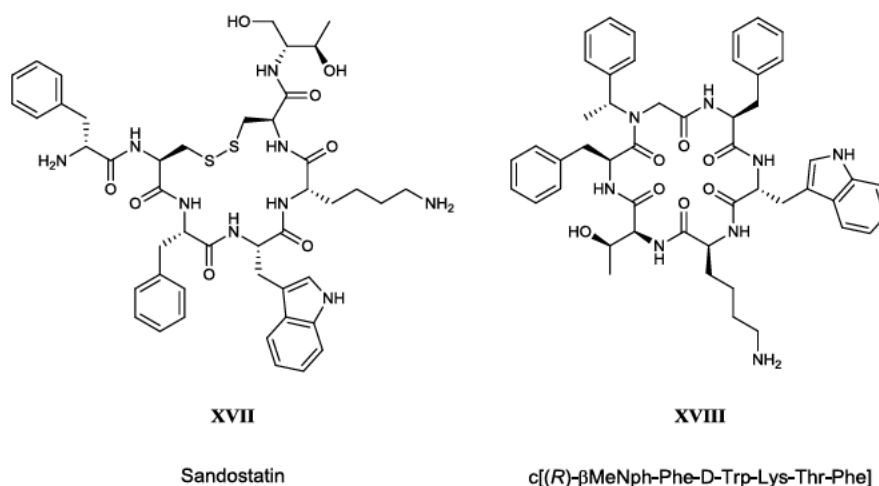
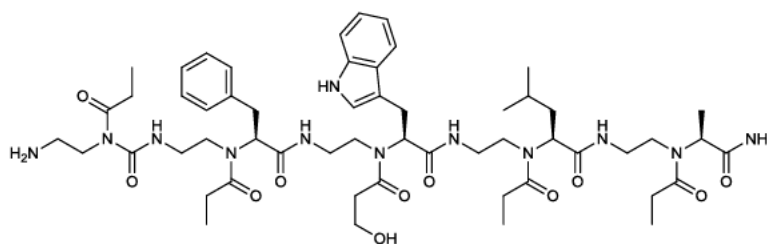
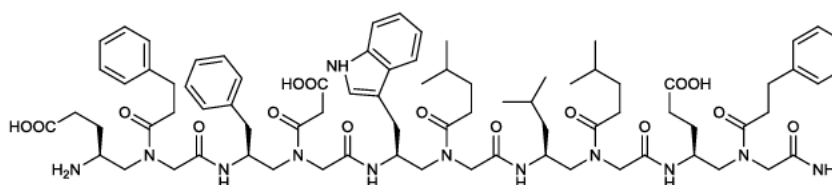


Abb. 2.16 Sandostatin **XVII** und ein Wirkstoffanalogon mit  $\alpha$ -Peptidpartialstruktur **XVIII**.

Eine den Peptoiden strukturell ähnliche Mimetikaklasse stellen die *N*-Acyl-*N*-Aminoethyl-Peptide dar. *Nielsen et al.*<sup>[109, 153]</sup> fanden eine Mimetikaklasse, die zunächst in der Aufklärung von DNA-Peptid-Wechselwirkungen ihre Anwendung fand. Diese sogenannten PNAs (peptide nucleic acids) können sequenzselektiv DNA-Stränge erkennen und binden, blieben aber als Peptidmimetika weitestgehend unbeachtet. Die Synthese solcher PNA-Analoga erfolgt in flüssiger Phase und bietet eine hohe Variationsmöglichkeit in der Seitenkette, ähnlich der Peptide. Erst in den letzten drei Jahren erhöhten sich die Forschungsbemühen in Richtung  $\alpha$ AA- und  $\gamma$ AA-Peptide, wodurch derzeit noch viele Fragen hinsichtlich Struktur und biologischer Anwendung unbeantwortet bleiben. Dennoch zeigen einige dieser neuartigen Verbindungen bereits ausgezeichnete physiologische Wirkung und könnten daher als Breitbandantibiotikum,<sup>[154]</sup> zellpenetrierendes Peptid<sup>[155]</sup>, mögliches Krebstherapeutikum oder als Strukturelement zur Verbesserung der Stabilität<sup>[135]</sup> eingesetzt werden. An dieser Stelle seien beispielhaft AA-Peptide gezeigt (Abb. 2.17), die aktiv in die p53/MDM2-Aggregation<sup>[156]</sup> und somit entscheidend in das Zellwachstum eingreifen können.<sup>[135, 157]</sup> Dabei handelt es sich bei Verbindung **XIX** um ein  $\alpha$ -AA-Peptid und bei Verbindung **XX** um ein  $\gamma$ -AA-Peptid.



XIX



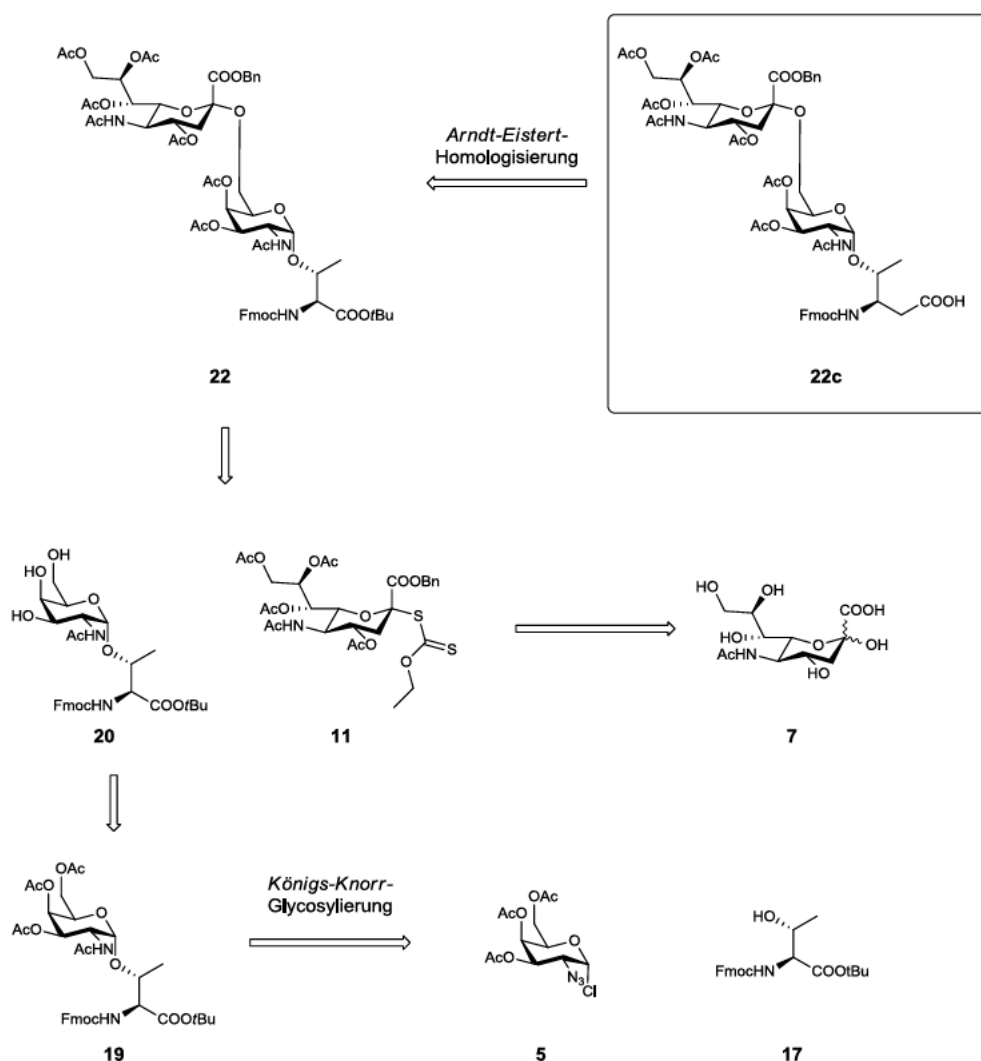
XX

Abb. 2.17 Ein  $\alpha$ -AA- **XIX** und ein  $\gamma$ -AA-Peptid **XX**, die die p53/MDM-Aggregation beeinflussen können.

Die *N*-Acyl-*N*-Aminoethyl-glycine wurden bisher noch nicht in Strukturelementen des MUC1 eingesetzt. Die hohe Variabilität der Seitenkette sowie die bisher bekannten Eigenschaften als stabilisierendes Element, lassen *N*-Acyl-*N*-Aminoethyl-glycine als vielversprechende Modifikationsmöglichkeit erscheinen.

### 3 Zielsetzung

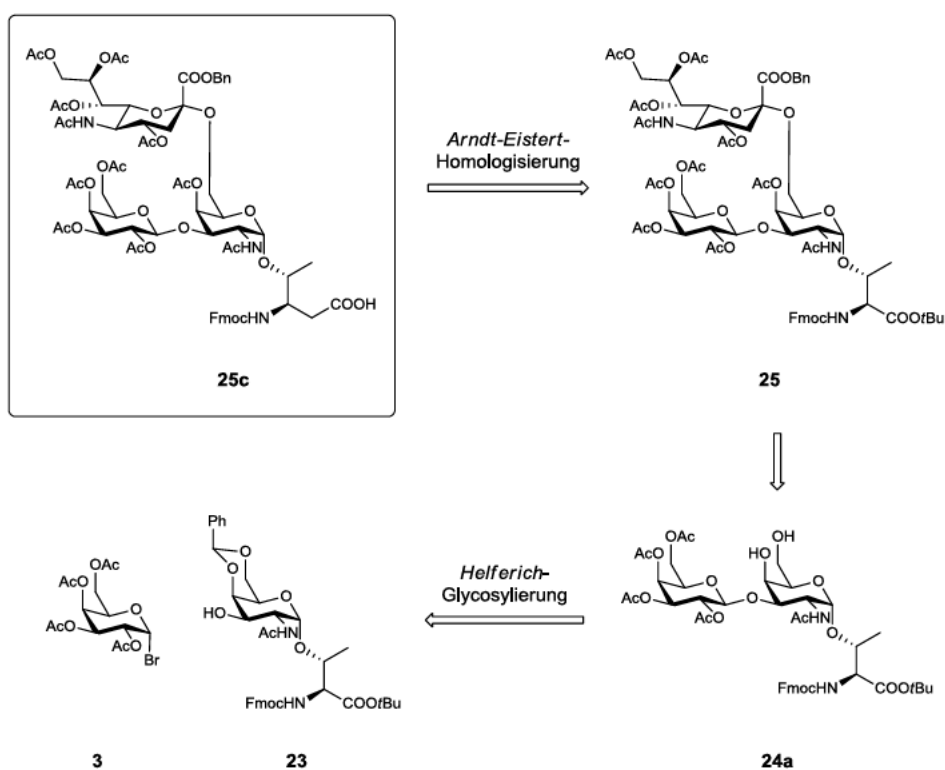
Der vorausgegangene Abschnitt beschreibt die Notwendigkeit, weiter nach wirksamen Strukturen zu suchen, die einerseits als Vakzin verwendet werden können und parallel eine erhöhte Immunogenität und metabolische Stabilität aufweisen. Dabei soll die vorliegende Arbeit an die Diplomarbeit von 2009 anknüpfen, in der bereits die Synthese verschiedener Tn-Antigenanaloga **XI** und **XII** und eines T-Antigenanalogons **XIII** auf Basis von  $\beta^3$ -homo-Threonin beschrieben wurde. Die komplexeren TACAs wie das sTn- und sT-Antigenanalogon konnten in der Diplomarbeit nicht synthetisiert werden, sodass nun diese Lücke geschlossen und ein praktikabler biomimetischer Zugang zu diesen Bausteinen entwickelt werden soll. Die Synthesen der noch ausstehenden sTn- und sT-Antigenanaloga sollen dabei literaturbekannten Synthesestrategien<sup>[125]</sup> unter Einsatz einer *Arndt-Eistert*-Homologisierung folgen. Für die Synthese des sTn-Antigens müssen daher



Schema 3.1 Retrosynthese des Fmoc- $\beta^3$ -hThr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuAcCOOBn-(2→6)- $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH **22c**.

zunächst das deblockierte Tn-Antigen<sup>[158]</sup> **20** und der Sialinsäuredonor<sup>[159-161]</sup> **11** dargestellt werden. Letzter kann in vier Stufen ausgehend von *N*-Acetylneuraminsäure **7** erhalten werden. Der freie Tn-Baustein **20** soll ausgehend von Azidochlorid<sup>[162]</sup> **5** und orthogonally geschütztem L-Threonin<sup>[158, 163-164]</sup> **17** hergestellt werden (vgl. Schema 3.1).

Die Darstellung des sT-Antigens erfolgt ebenfalls ausgehend von dem an den Hydroxylgruppen deblockierten Tn-Antigenanalogon **20**, das nach Schutzgruppenmanipulation zunächst zum T-Antigenanalogon<sup>[165]</sup> **24a** und schließlich zum sT-Antigenanalogon<sup>[166]</sup> **25** glycosyliert werden soll.

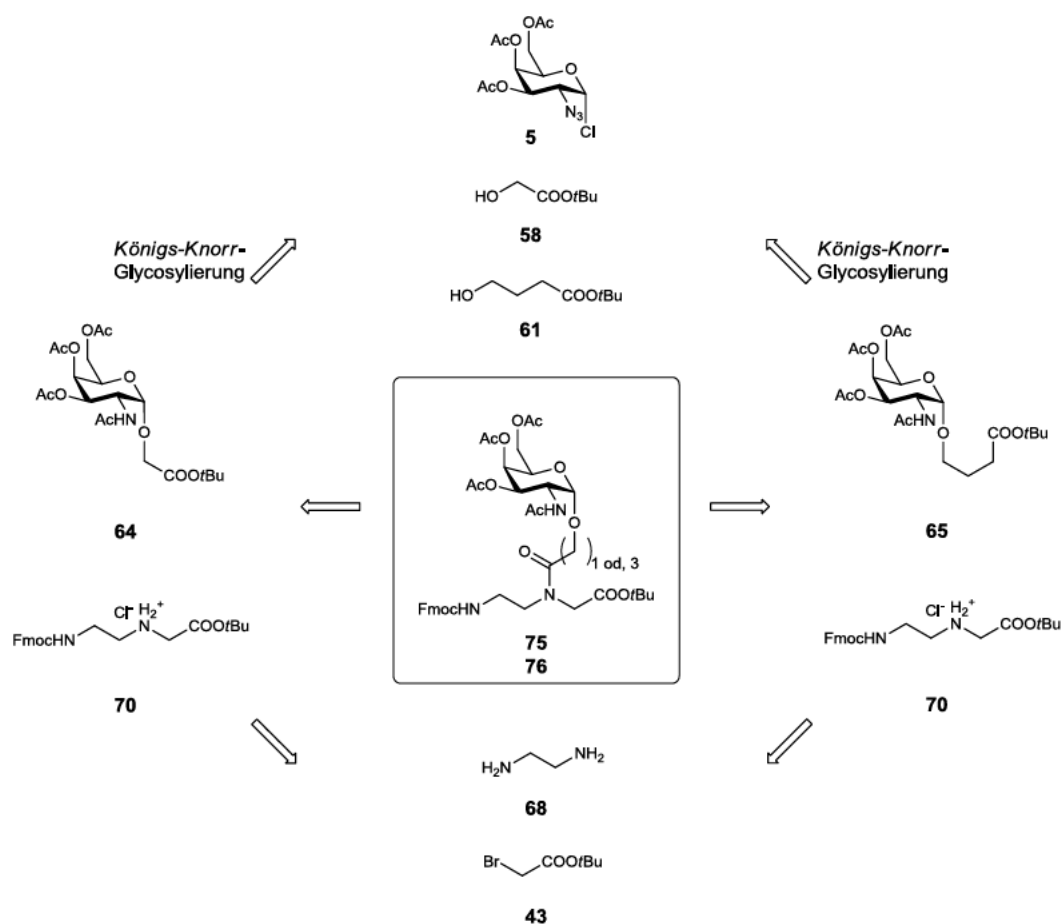


Schema 3.2 Retrosynthese des *Fmoc*- $\beta^3$ -*hThr*( $\beta$ Ac<sub>4</sub>Gal-(1→3)-[ $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuAcCOOBn-(2→6)]- $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH **25c**.

Abschließend soll die Synthese von  $\alpha/\beta$ -Hybridpeptiden und der sich anschließende Verdau in einem Enzym-Modellsystem die Stabilität solcher Strukturen und ihre Eignung in der Entwicklung von Krebsvakzinen aufzeigen.

In einem zweiten Projekt soll die Eignung von *N*-Acyl-*N*-aminoethyl-Hybridpeptiden als alternatives Strukturmerkmal überprüft werden. Wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben wurde, eignen sich die AAPs als stabilisierendes Element mit einer großen Anzahl an Variationsmöglichkeiten, die zum einen in der Wahl der Rückgratstruktur ( $\alpha$ - oder  $\gamma$ -acyliert) aber auch im Abstand der eingebrachten Funktionalitäten zum Rückgrat liegen können. In der Literatur sind derzeit noch keine Glyco-*N*-Acetyl-*N*-aminoethyl-Peptide oder Synthesen für ein solches Vorhaben bekannt. Für einen ersten Zugang sollen Aminosäureanaloge auf struktureller Basis der PNAs gewählt und der Abstand der

Kohlenhydratreste zum Rückgrat über die Länge der Acylkette variiert werden. Hierzu werden 2-Hydroxyessigsäure<sup>[167]</sup> **58** und  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure<sup>[168-169]</sup> **61**, welche aus Glycin **56** bzw. Bernsteinsäureanhydrid **59** darstellbar sind, gewählt. Der Aufbau der Festphasenbausteine soll zunächst parallel verlaufen. Die Alkohole sollen analog zu Threonin in einer *Königs-Knorr*-Glycosylierung mit Azidochlorid **5** reagieren. Der Aufbau des Rückgrats soll analog zu den in der Literatur<sup>[170-171]</sup> beschriebenen Methoden erfolgen. Erst im letzten Schritt soll die Amidbindung zu den Tn-Analoga **75** und **76** geknüpft werden. Entsprechend der  $\beta$ -Aminosäuren sollen auch für die so erhaltenen Glyosylaminosäureanaloga Hybridpeptide synthetisiert werden.



Schema 3.3 Retrosynthese der AAPs.

Es gibt vielfältige Variationsmöglichkeiten in der *tandem repeat unit* des humanen MUC1. Allerdings bieten sich einige Stellen besonders an. Zum einen können dadurch Strukturmerkmale wie z.B. die (A)PDTRPAP-Sequenz stabilisiert werden, zum anderen kann der Synthesaufwand durch die Auswahl einer vermehrt vorkommenden Aminosäure minimiert werden. Daher bietet sich neben den potenziellen Glycosylierungsstellen auch Alanin an, das in der 20 Aminosäuren zählenden Wiederholungseinheit vielmals vorkommt. Neben der Glycosylaminosäuren sollen daher auch  $\beta^3$ -homo-Alanin und *N*-Acetyl-*N*-Aminoethyl-glycin synthetisiert. Letztere sollen das im 20mer des MUC1



vorkommende Alanin substituieren. Die Stabilität der so erhaltenen Hybridpeptide soll in Abbaustudien getestet werden.

Für die Abbaustudien und die Enzymwahl gelten folgende Überlegungen: Das Enzym soll möglichst viele Schnittstellen innerhalb der 20 Aminosäuren besitzen, kostengünstig und leicht abzutrennen sein. Der Verlauf des Enzymverdaus soll per HPLC bestimmt werden. Hierzu sollen Kalibrierungsgeraden aufgenommen und der Restgehalt an Peptid in Lösung zu bestimmten Zeitenpunkten festgestellt werden.

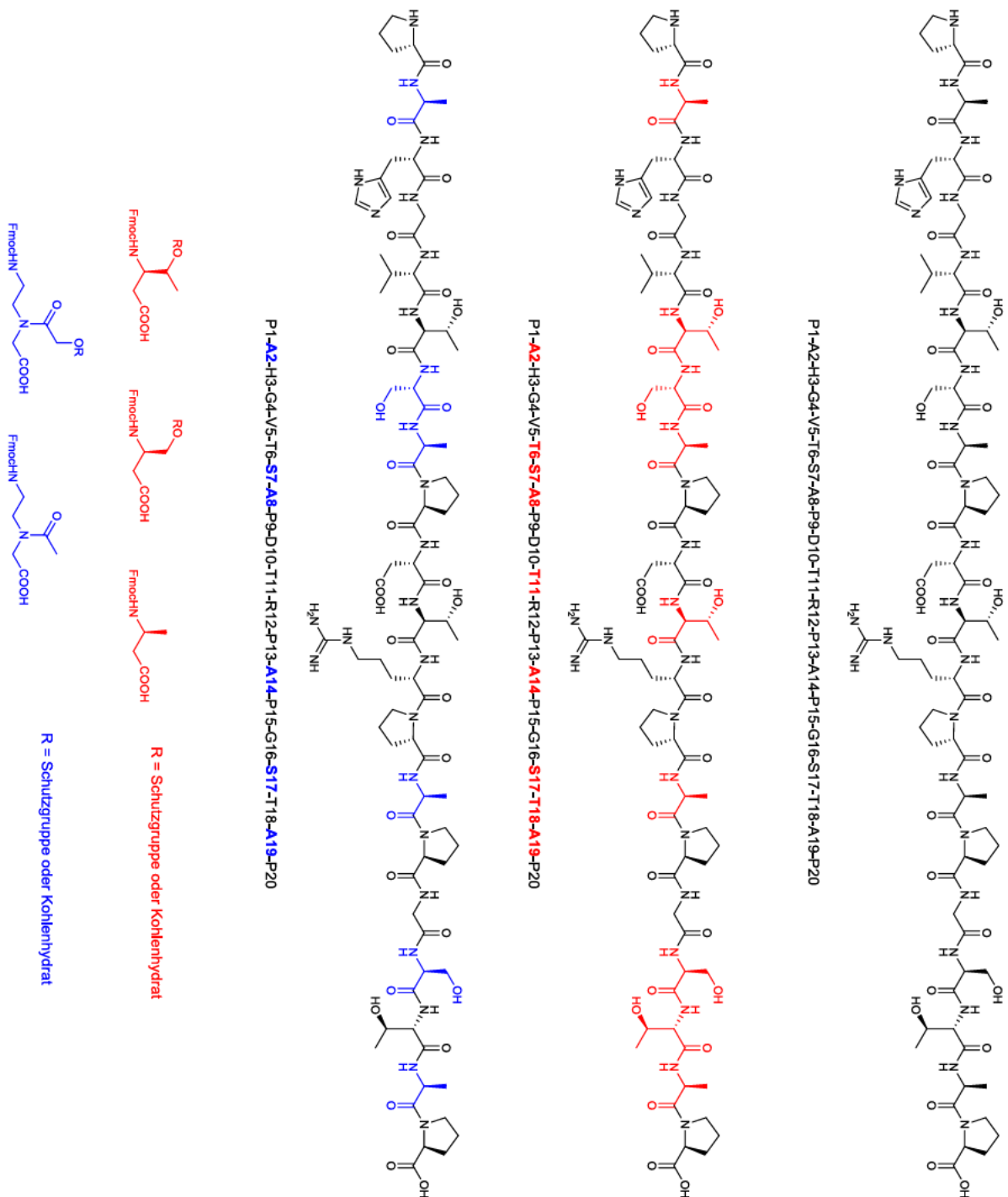


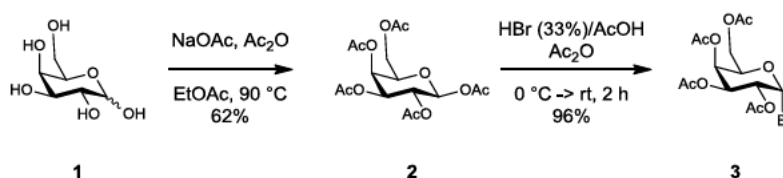
Abb. 3.1 Die Abbildung zeigt die MUC1-tandem repeat unit. Natürliche Aminosäuren sind schwarz dargestellt. Mögliche Modifikationspositionen sind farbig gekennzeichnet. Dabei steht **rot** für  $\beta^3$ -Aminosäuren und **blau** für die AAP-Elemente.



## 4 Allgemeiner Teil

### 4.1 Synthese der Galactosebausteine

Die Darstellung des Azidobromids **6** und des Azidochlorids **5** zur Synthese der zentralen Glycosylaminosäure-Analoga **19** bzw. **75** und **76** erfolgte nach literaturbekannten Strategien. Hierzu wurde D-Galactose **1** zunächst peracetyliert<sup>[172-173]</sup> und in einer weiteren Reaktion mit Bromwasserstoff (33%ig) in Eisessig ausschließlich zum entsprechenden  $\alpha$ -ständigen Bromid **3** umgesetzt.<sup>[174-175]</sup> Letzteres diente sowohl als Edukt für die Synthese des D-Galactals **4** wie auch als Donor in einer *Helferich*-Glycosylierung für den späteren Aufbau der sT- bzw. T-Antigenanaloga **25a** bzw. **82** (vgl. Schema 4.1).



Schema 4.1 Synthese des Galactosylbromids **3**.

Die Selektivität der Reaktion ist auf den anomeren Effekt zurückzuführen. Im Verlauf der Reaktion wird zunächst die anomere Acetylgruppe protoniert und damit in Essigsäure als Abgangsgruppe überführt. Das hierbei entstehende Oxocarbeniumion kann nun entweder von der äquatorialen oder von der axialen Seite her substituiert werden. Aus thermodynamischen Gründen wäre eine äquatoriale Substitution in cyclischen, sesselförmigen Verbindungen begünstigt (fehlende 1,3-diaxiale Wechselwirkung). Allerdings beobachtet man bei Kohlenhydraten mit elektronegativen Substituenten häufig die Bildung des  $\alpha$ -anomenen Produkts. Diesem Phänomen liegen nach *Lemieux*<sup>[176]</sup> im Wesentlichen zwei Effekte zugrunde:

1. Die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der freien Elektronenpaare des Ringsauerstoffs und der C-X-Bindung kompensieren sich im  $\alpha$ -konfigurierten Produkt partiell, was zu einem verringerten Dipolmoment und damit zu erhöhter thermodynamischer Stabilität führt (Abb. 4.1)
2. Betrachtet man die Molekülorbitale, so ist im  $\alpha$ -konfigurierten Produkt eine Überlappung eines freien Elektronenpaares mit dem  $\sigma^*$ -Orbital der C-X-Bindung möglich. Die resultierende Hyperkonjugation führt zur Delokalisierung der Elektronen und damit ebenfalls zur Stabilisierung des Produkts (Abb. 4.1).

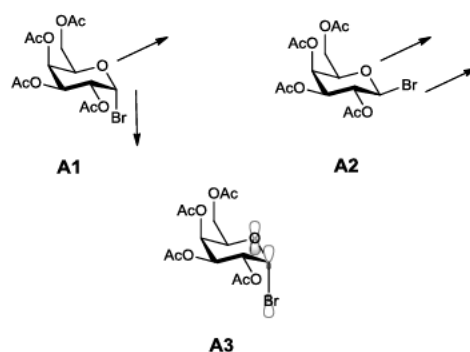
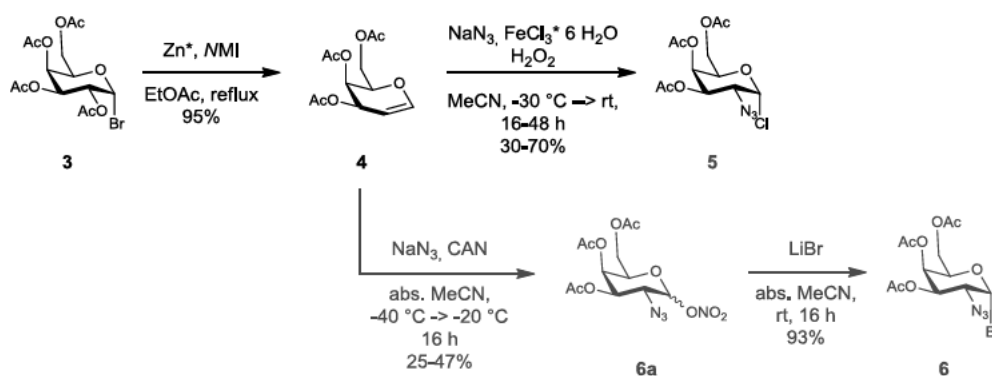


Abb. 4.1 Dipolmomente und Hyperkonjugation in Galctosylbromid 3.

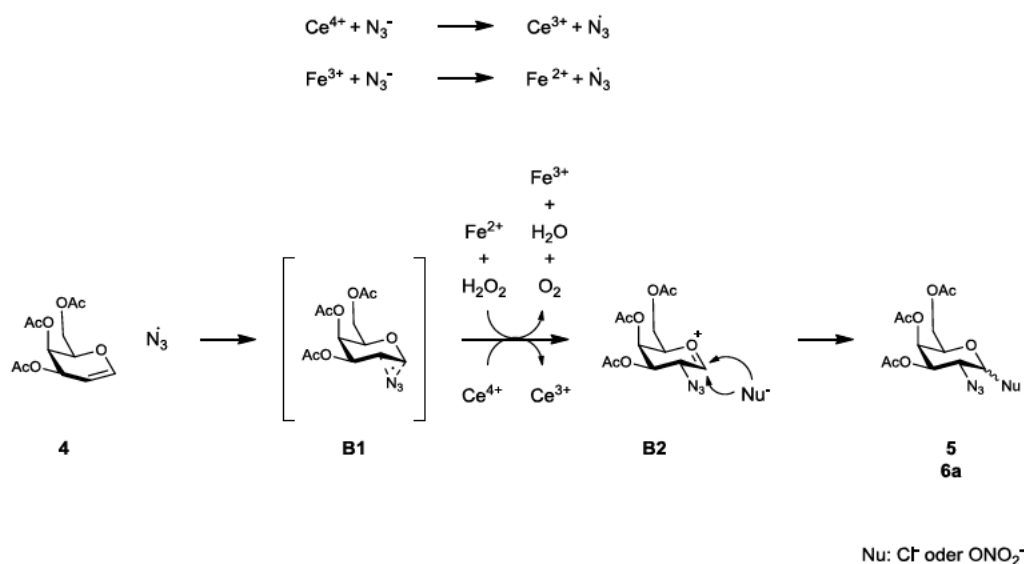
Zur Darstellung des Azidobromids **6** bzw. Azidochlorids **5** wurde das Bromid **3** zunächst unter reduktiven Bedingungen mit Zink und *N*-Methylimidazol in refluxierendem Ethylacetat zum D-Galactal **4** umgesetzt (Schema 4.2). Es wird vermutet, dass ein Zink-*N*-Methylimidazol-Komplex entsteht, der es dem Zink ermöglicht in die C-Br-Bindung zu insertieren, bevor es zu einer Eliminierung einer Zinkspezies analog einer Reformatzki-Reaktion kommt. Dabei wird der für die Eliminierung notwendige Carbanioncharakter des C1 vermehrt durch die Wahl der stickstoffhaltigen Base beeinflusst.<sup>[177]</sup> Glycal **4** reagiert in einer weiteren Reaktion nach *Plattner et al.*<sup>[162]</sup> mit Natriumazid, Eisen(III)chlorid und Wasserstoffperoxid zum Azidochlorid **5**. Ein alternativer Syntheseweg, Galactal **4** in einer Azidonitratisierung nach *Lemieux*<sup>[178]</sup> zu Azidonitrat **6a** umzusetzen und anschließend einer Substitution mit Lithiumbromid zum Azidobromid **6** zu unterwerfen,<sup>[175]</sup> wurde aufgrund nicht reproduzierbarer Ergebnisse verworfen.



Schema 4.2 Darstellung des Azidobromids **6** bzw. Azidochlorids **5**.

Der von *Lemieux*<sup>[178]</sup> bzw. für die Azidochlorierung postulierten Mechanismen sind in Schema 4.3 dargestellt. Dabei wird sowohl in der Azidonitratisierung als auch in der Azidochlorierung das Azidion durch die vorhandenen Metallsalze, die in beiden Fällen als ein-Elektron-Überträger fungieren, oxidiert. Die Bildung des kationischen Triazols sollte in beiden Fällen ähnlich verlaufen, wobei letzteres in der Reaktion nach *Lemieux* durch überschüssiges Cer(IV) oxidiert wird. In der Azidochlorierung, wie sie von *Plattner et al.*<sup>[162]</sup> beschrieben wird, sollte durch Wasserstoffperoxid regeneriertes Eisen(III) als Oxidationsmittel dienen. Die isolierten Ausbeuten an Azidochlorid **5** bzw. Azidobromid **6**

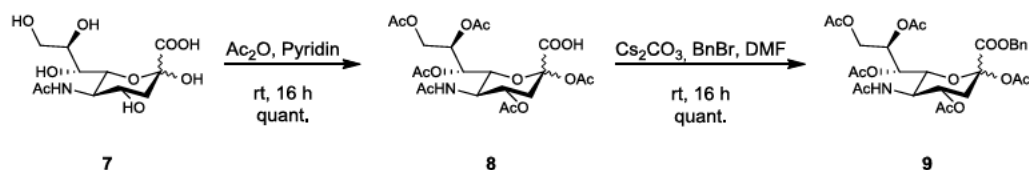
waren bezogen auf Galactal **3** je nach Verlauf der Azidonitratisierung vergleichbar. Allerdings ist die Reaktion zum Donor **5** nach der beschriebenen Variante mit weniger Aufwand verbunden, während gerade die Azidonitratisierung keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferte. Die von den Autoren geschilderten Isomerisierungen zum  $\beta$ -ständigen Chlorid nach einer Säulenchromatographie konnten nicht in dem beschriebenen Maße beobachtet werden.<sup>[162]</sup> Eine Trennung der Isomere war nur schwer möglich, allerdings konnte im Verlauf der Glycosylierungen darauf verzichtet werden, da zum einen die *Königs-Knorr*-Glycosylierung nach einem  $S_N1$ -artigen Mechanismus<sup>[179-180]</sup> verläuft und zum anderen die Anteile an  $\beta$ -ständigen Glycosylierungsprodukten mit denen vergleichbar waren, die aus den Reaktionen mit reinem  $\alpha$ -ständigem Azidobromid hervorgingen.



Schema 4.3 Mechanismus der Azidochlorierung bzw. Azidonitratisierung.

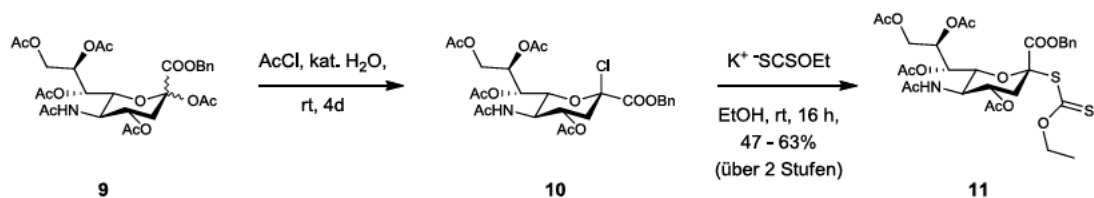
## 4.2 Synthese der Sialinsäurebausteine

Stereoselektive  $\alpha$ -Sialylierungen gelten bedingt durch die besondere Struktur der *N*-Acetylneuraminsäure generell als anspruchsvoll (vgl. Abschnitt 4.3 und 4.5). Für die direkte chemische Sialylierung gibt es mehrere, zum Teil sehr effiziente Donoren mit unterschiedlichen Abgangsgruppen und Promotoren.<sup>[181-182]</sup> Als besonders geeignet erweisen sich eher ungewöhnliche Abgangsgruppen wie anomere Phosphite<sup>[183]</sup> und Xanthogenate.<sup>[160]</sup> Andere gängige Donoren wie z.B. Fluoride oder Trichloracetimide, die in anderen Glycosylierungen sehr effizient eingesetzt werden können, finden eher selten Anwendung. In dieser Arbeit werden die von Marra und Sinay<sup>[160]</sup> eingeführten Xanthogenatdonoren der Sialinsäure eingesetzt, die sich bereits in vorangehenden Arbeiten als besonders geeignet für die Sialylierung der GalNAc-6-OH-Gruppen erwiesen.<sup>[44, 166, 184]</sup> Die Darstellung von Donor **11** erfolgte nach einer literaturbekannten Methode. Zunächst wurde *N*-Acetylneuraminsäure **7** in Pyridin und Acetanhydrid zur peracetylierten Verbindung **8** umgesetzt.<sup>[185-186]</sup> Letztere wurde mit Cäsiumcarbonat in das in DMF gut lösliche Cäsiumcarboxylat überführt, das anschließend mit Benzylbromid zum vollständig geschützten *N*-Acetylneuraminsäure-Derivat **9** reagierte.<sup>[187-188]</sup>



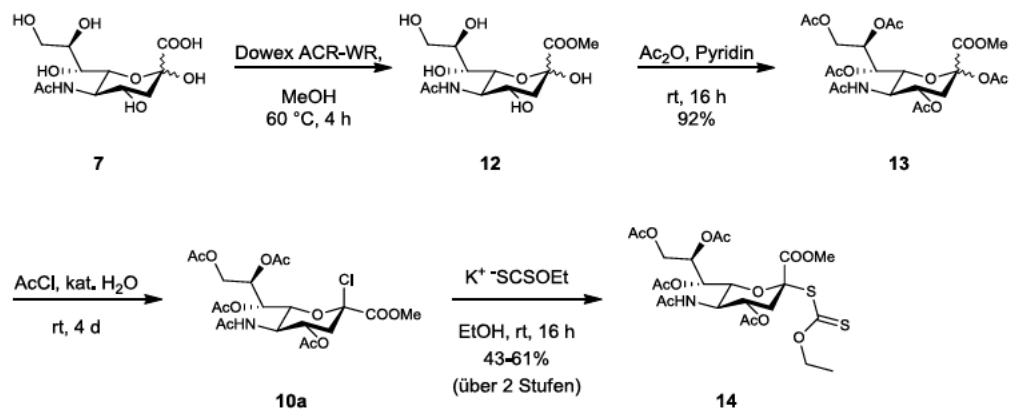
Schema 4.4 Synthese der vollständig geschützten Donorvorstufe **9**.

Das vollständig geschützte Sialinsäurederivat **9** reagierte mit Chlorwasserstoff, der *in situ* aus Acetylchlorid und katalytischen Mengen Wasser erzeugt wurde, zunächst zum  $\beta$ -ständigen Chlorid **10**, das in einer nucleophilen Substitution mit Kaliummethylxanthogenat den Xanthogenatdonor **11** lieferte.<sup>[44, 160]</sup>



Schema 4.5 Synthese des Xanthogenatdonors **11**.

Für Donor **14** wurde *N*-Acetylneuraminsäure **7** zunächst mit Methanol und saurem Ionentauscher Dowex ACR-WR<sup>®</sup> zum Methylester **12** umgesetzt, der analog zu Verbindung **7** in einem Gemisch aus Pyridin und Acetanhydrid zum vollständig geschützten Derivat **13** reagierte.<sup>[189]</sup> Die nachfolgenden Schritte zum Xanthogenatdonor **14** erfolgten analog zu Verbindung **11**.<sup>[160]</sup>



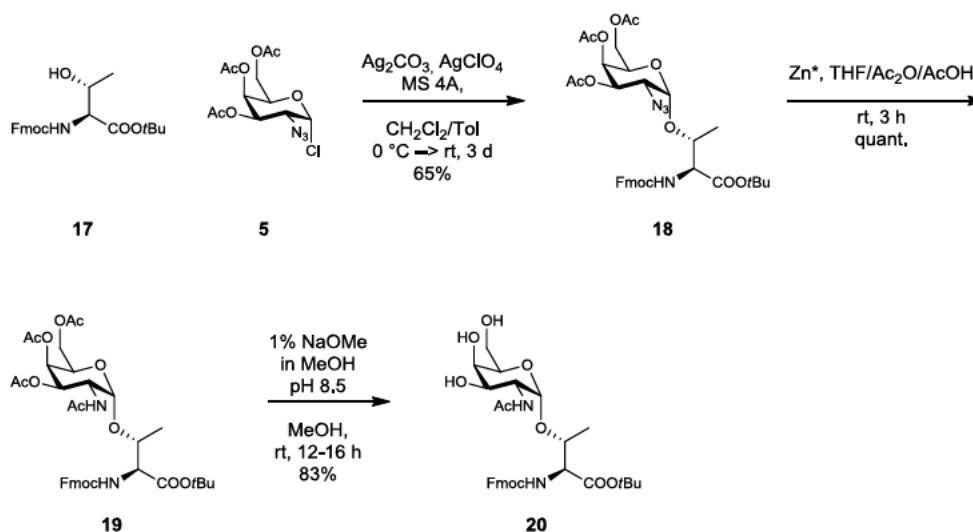
Schema 4.6 Synthese des Sialinsäuredonors **14**.

Beide Donoren werden in der Literatur verwendet, wobei berichtet wird, dass der Benzylester gegenüber dem Methylester unter milden hydrogenolytischen Bedingungen gespalten werden kann.<sup>[190]</sup> Der Vorteil des Methylesters dagegen liegt in der Wahl der Reaktionsbedingungen für die Deblockierung der Carboxylgruppe. Letztere kann mit den Acetylschutzgruppen der Zuckerbausteine zusammen in einem Reaktionsschritt unter wässrigen basischen Bedingungen gespalten werden.





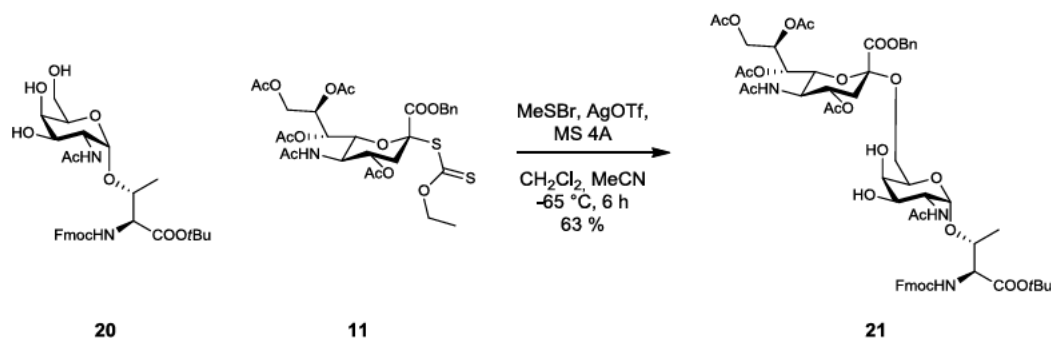
Bildung von *O*-Alkyl-*N,N'*-dicyclohexylisoharnstoff **C3** verläuft, mindert die Bildung von Anhydriden und *N*-Acyl-Harnstoffen, die i.d.R. keine weitere Verwendung finden.<sup>[194]</sup> Da bei dieser Reaktion größere Mengen an *iso*-Buten entstehen können, ist ein großer Überschuss an DCC und *tert.*-Butanol notwendig, der zu großen Mengen Cyclohexylharnstoff am Ende der Reaktion führt. Letzterer muss vor dem Reinigungsschritt durch Flash-Säulenchromatographie sorgfältig ausgefällt werden. Unvollständig ausgefallter Harnstoff führte während der Flash-Säulenchromatographie zu einem hohen Gegendruck und konnte nicht vollständig abgetrennt werden. Zur Herstellung des zentralen Tn-Bausteins **19** wurde Threonin **17** mit Azidochlorid **5** in einer modifizierten *Königs-Knorr*-Glycosylierung<sup>[195]</sup> nach *Paulsen* und *Hölck*<sup>[196]</sup> umgesetzt. Als Promotoren dienten das im Lösungsmittelgemisch (Dichlormethan/Toluol) lösliche Silberperchlorat und Silbercarbonat als unlösliches Silberreservoir. Der fehlende Nachbargruppen effekt der Azidogruppe und der bereits erläuterte anomere Effekt bei elektronegativen Substituenten lassen stereoselektiv das  $\alpha$ -konfigurierten Konjugat **18** entstehen. Reste des  $\beta$ -Anomers konnten durch Säulenchromatographie entfernt werden. Der so erhaltene Tn-Vorläufer **18** wurde mit aktiviertem Zink zum Acetamid **19** reduziert. Der so erhaltene Tn-Vorläufer **18** wurde mit aktiviertem Zink zum Acetamid **19** reduziert.



Schema 4.8 Darstellung des deblockierten Tn-Antigenanalogons **20**.

Letzteres diene als Edukt zur Synthese der sTn- und sT-Antigene. Zur Darstellung des sialylierten Tn-Antigens wurde das Tn-Antigen **19** mit Natriummethanolat in Methanol in einer modifizierten *Zemplén*-Veresterung<sup>[197]</sup> deblockiert.<sup>[158]</sup> Dabei ist eine ständige Kontrolle des pH-Werts essentiell. Ein pH-Wert, welcher 8.5 überschreitet, kann nicht nur zum Verlust der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe führen, sondern kann auch eine  $E_1c_b$ -Eliminierung einleiten, die mit dem Verlust des Kohlenhydratrests als Abgangsgruppe einhergeht. Einen Verlust der Fmoc-Gruppe kann man kompensieren, indem man das Rohprodukt nach der Deblockierung der Hydroxylgruppen erneut mit 10-20mol% Fmoc-OSu in Acetonitril oder Dichlormethan unter basischen Bedingungen versetzt. So konnten 83% des freien Tn-Antigens **20** erhalten werden. Der freie Alkohol **20** konnte schließlich

mit Xanthogenat **11** stereo- und regioselektiv zum  $\alpha(2\rightarrow6)$ -sTn-Analogon **21** umgesetzt werden (vgl. Schema 4.9).

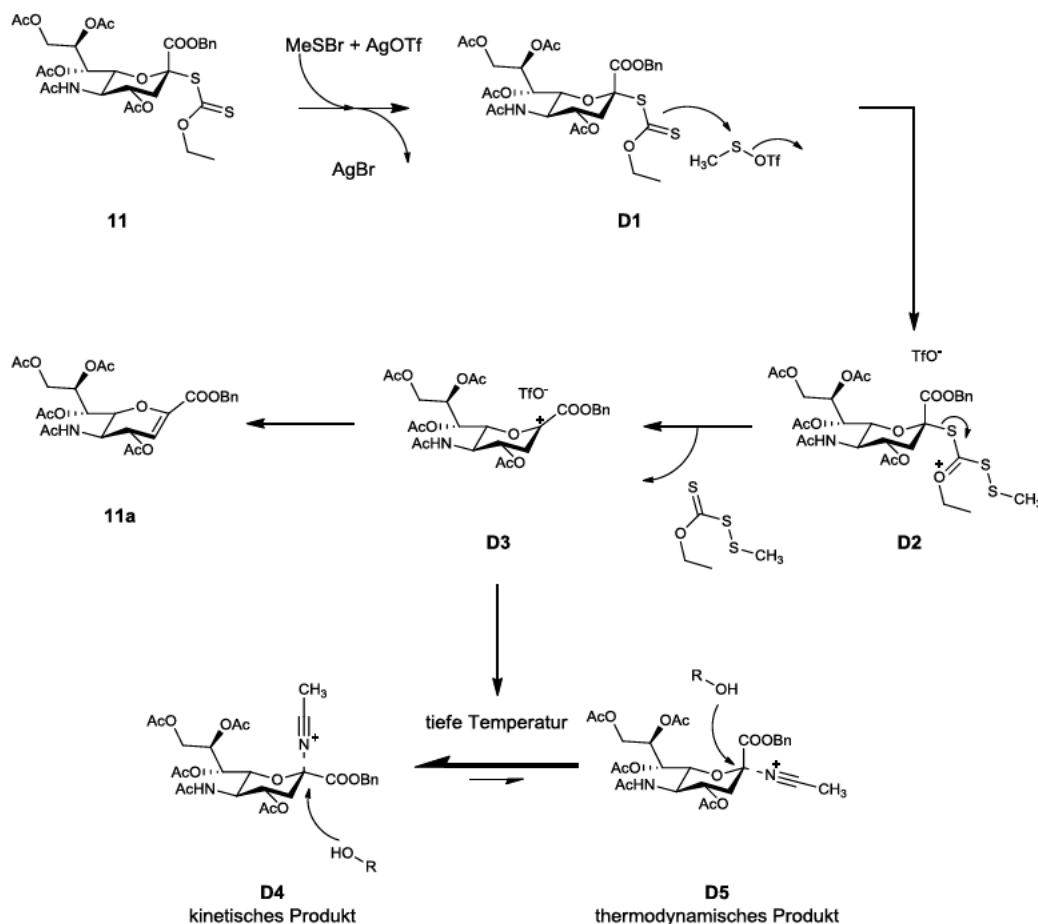


Schema 4.9 Synthese des sTn-Antigens **21**.

Xanthogenate lassen sich durch verschiedene thiophile Promotoren aktivieren.<sup>[198]</sup> Zu den gängigsten Aktivierungsreagenzien gehören Methylsulfenyltriflat<sup>[199]</sup>, Dimethyl(methylthio)sulfonium-triflat<sup>[159, 200]</sup> und Kombinationen aus *N*-Iodsuccinimid und Trifluormethan-sulfonsäure.<sup>[201-202]</sup> Zur Synthese des sTn-Antigens wird Xanthogenat **11** mit Methyl-sulfenyltriflat aktiviert, welches sich *in situ* aus Methylsulfenylbromid und Silbertriflat herstellen lässt. Methylsulfenylbromid entsteht bei der Behandlung von Dimethyldisulfid mit äquimolaren Mengen an elementarem Brom.<sup>[203]</sup> Dabei folgt die Aktivierung des Xanthogenats dem in Schema 4.10 gezeigten Mechanismus. Zunächst wird das Methylsulfenyltriflat aus Methylsulfenylbromid und Silbertriflat gebildet. Dieses stark thiophile Reagenz wird vom elektronenreichen Schwefel der C=S-Gruppe koordiniert und generiert somit ein Disulfid **D2**. Intermediär entsteht aus diesem Komplex ein durch den Ester destabilisiertes Oxocarbeniumion **D3**. Die Wahl des Lösungsmittels und der Reaktionstemperatur tragen entscheidend zur Stereochemie des neu gebildeten quaternären Kohlenstoffs bei.<sup>[204-205]</sup> Bei der Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel wird das Oxocarbenium durch die Ausbildung eines Nitriliumkomplexes stabilisiert.<sup>[206]</sup> Dabei kann die Koordination von der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -anomeren Seite erfolgen. Für tiefe Temperaturen wird die Koordination kinetisch kontrolliert und führt zum axialen Nitriliumkomplex. Die Substitution durch die primäre Hydroxylgruppe des Tn-Bausteins **20** kann somit von der  $\alpha$ -Seite erfolgen und führt zum  $\alpha(2\rightarrow6)$ -konfigurierten sTn-Antigen **21**. Die Reaktion wird bei einer Temperatur von -65 °C und unter Einsatz von 2.5-3 Äquivalenten des Xanthogenatdonors durchgeführt. Ein Anteil von 33% Dichlormethan im Reaktionsgemisch verhindert das Einfrieren der Reaktionslösung. Das Einhalten der Temperatur ist unbedingt notwendig, nicht alleine um die Bildung des  $\beta$ -Anomers zu minimieren, sondern auch um die bei höheren Temperaturen vermehrt ablaufende  $\beta$ -Eliminierung zu unterdrücken. Der in Schema 4.10 gezeigte Mechanismus zur Aktivierung von Xanthogenaten wurde 1996 von Martichonok und Whitesides<sup>[207]</sup> für den entsprechenden Methylester publiziert. Sie zeigten auch, dass eine Aktivierung der Sialinsäurexanthogenate durch Phenylsulfenylchlorid und Silbertriflat mit komplexeren



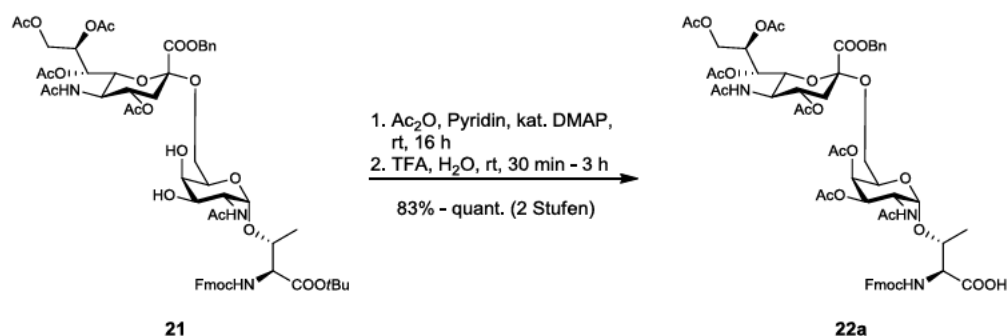
Kohlenhydraten zu besseren Ausbeuten führten. *Dziadek et al.* konnten für die Benzylester geschützten Xanthogenatdonoren allerdings einen gegenläufigen Trend beobachten.<sup>[208]</sup>



Schema 4.10 Aktivierung der Xanthogenate durch Methylsulfenylbromid und Silbertriflat.

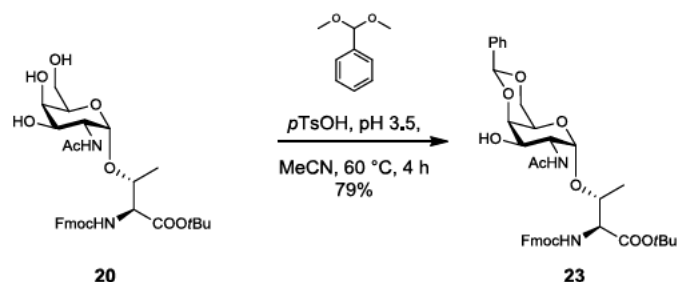
In den durchgeführten Synthesen zu den sTn- und sT-Threonin-Konjugaten **22** und **25a** konnte keine Bildung der  $\beta$ -Anomere festgestellt werden. Bedingt durch die besondere Struktur der *N*-Acetylneuraminsäuren kann auch die Analytik sialylierter Verbindungen zu ungewohnten Herausforderungen führen. So existiert kein Proton am Kohlenstoff Sia-C2, das über eine Kopplung zu den Protonen an Sia-C3 Aufschluss über eine  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Konfiguration geben könnte. Eine eindeutige Bestätigung für eine  $\alpha$ -Verknüpfung besteht allerdings in der Kopplung von Sia-H3ax zu Sia-C1 im HMBC-NMR-Experiment. In  $\alpha$ -verknüpften Glycosiden nehmen das Sia-H3ax und der Sia-C1 einen Torsionswinkel von ungefähr  $180^\circ$  ein. Dies führt nach der *Karplus-Beziehung*,<sup>[209-210]</sup> welche die vicinalen Kopplungskonstanten in Abhängigkeit des Torsionswinkels  $\Phi$  beschreibt, zu einer großen Kopplungskonstante. Dementsprechend findet man im HMBC-Spektrum einen Kreuzpeak zwischen Sia-H3ax und Sia-C1 für eine  $\alpha$ -Verknüpfung. Für ein entsprechendes  $\beta$ -Konjugat findet man eine schwache axiale-äquatoriale Kopplung, die im HMBC-Spektrum keine Korrelation zeigen. Ebenfalls findet man für den äquatorialen Wasserstoff Sia-H3äq aufgrund der schwachen Kopplung weder für  $\alpha$ - noch für  $\beta$ -Verknüpfungen eine Korrelation zu Sia-C1. Nach Acetylierung der freien Hydroxylgruppen in

Essigsäureanhydrid und Pyridin mit 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin analog einer *Steglich*-Veresterung und Deblockierung der Carboxylgruppe erhielt man die freie Säure **22a**, die als Edukt zur Herstellung des neuen  $\beta^3$ -homo-Threonin-sTn-Bausteins **22c** diente.



Schema 4.12 Darstellung des für die Arndt-Eistert-Reaktion geschützten sTn-Antigens **22a**

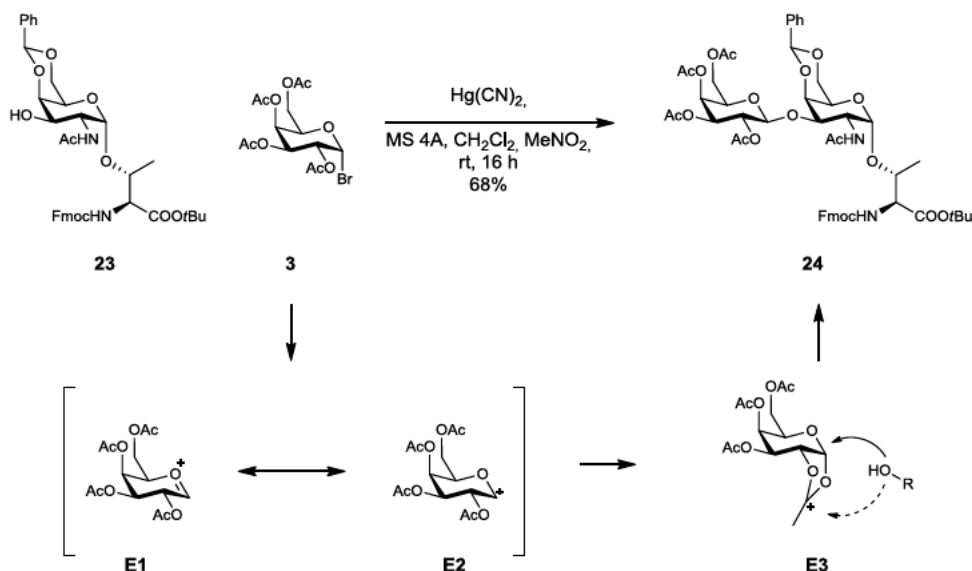
Die Synthese des sT-Analogons erfolgte ausgehend von dem deblockierten Tn-Antigenanalogon **20**, das mit Benzylidendimethylacetal in Acetonitril bei 60 °C zum entsprechenden 4,6-Benzyliden geschützten Tn-Antigenderivat **23** reagierte (Schema 4.12).



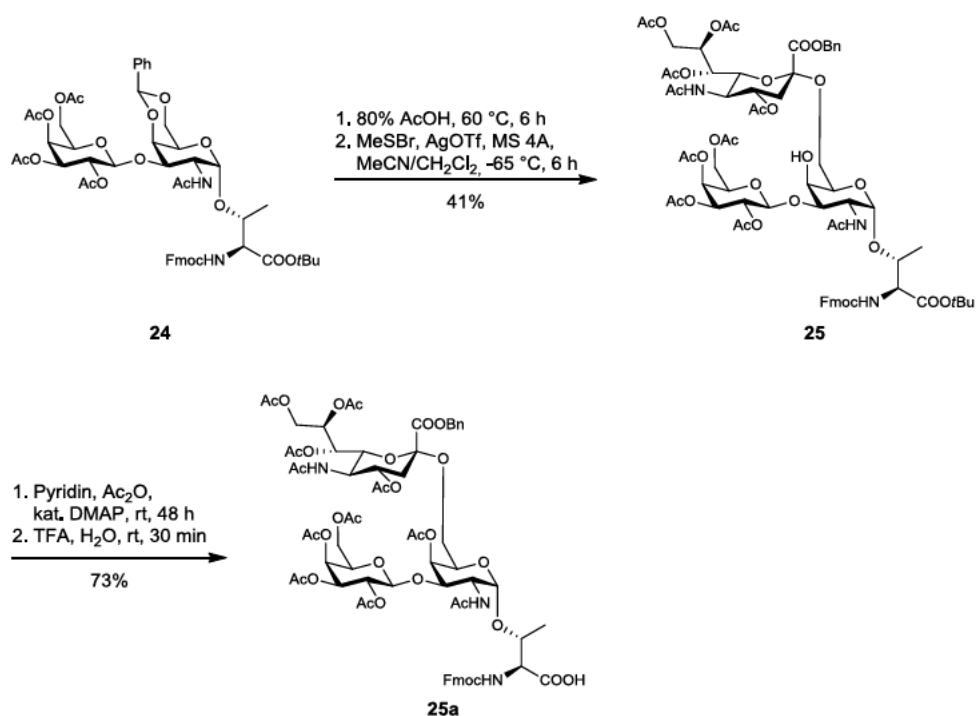
Schema 4.11 Blockierung der 4- und 6-Position des Tn-Antigens **23**.

Letzteres konnte mit dem Acetylbromid **3** in einer *Helferich*<sup>a</sup>-Glycosylierung<sup>[211-212]</sup> mit Quecksilber(II)cyanid zum T-Antigen **24** umgesetzt werden. Dabei trat aufgrund des Nachbargruppeneffekts der Acetylgruppe in 2-Position ausschließlich das  $\beta$ -konfigurierte Produkt auf. Der Mechanismus der Reaktion verläuft wie in Schema 4.14 gezeigt. Dabei wird durch einen Promotor – in diesem Fall Quecksilber(II)cyanid – ein Oxocarbeniumion **E1** und **E2** erzeugt, das von der Unterseite durch die benachbarte Acetylgruppe stabilisiert wird. Dieses Intermediat kann in einer  $S_N1$ -Reaktion von einem Alkohol abgefangen werden. Eine mögliche Nebenreaktion zum Orthoester ist durch den gestrichelten Pfeil dargestellt (**E3**), allerdings spielt diese Reaktion beim Einsatz des Galactosylbromids **3** keine Rolle.

<sup>a</sup> Burkhard Helferich führte die erste „Helferich“-Glycosylierung eigentlich unter Silbersalzkatalyse und damit unter *Königs-Knorr*-Bedingungen durch und erwartete wohl ein  $\alpha$ -Glycosid, wie man der Literatur entnehmen kann. Erst ein negatives Ergebnis mit einer  $\alpha$ -Glycosidase ließ ihn vermuten, dass es sich um ein  $\beta$ -Glycosid handeln musste.

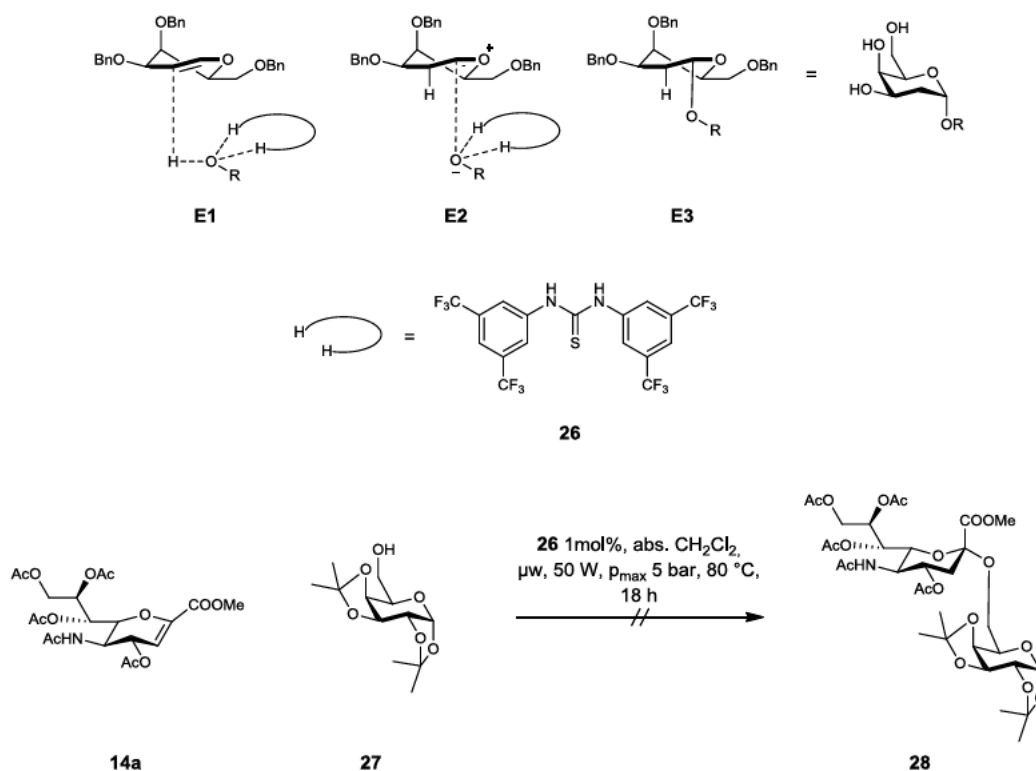
Schema 4.14 Synthese des T-Antigens **24**.

Die Deblockierung der 4- und 6-Position des T-Antigens **24** erfolgte mit 80%-iger Essigsäure und eine anschließende Glycosylierung mit Xanthogneatdonor **11** führte zum sT-Antigen **25**. Acetylierung der freien Hydroxylgruppe und Deblockierung des C-Terminus nach der für das sTn-Aantigen **22a** beschriebenen Prozedur führte zur freien Säure **25b**, die als Edukt in der *Arndt-Eistert*-Reaktion eingesetzt wurde.

Schema 4.13 Synthese des sT-Antigenanalogons **25b**.

Reaktionen mit Sialinsäuredonoren können wie bereits erwähnt aufgrund des fehlenden Nachbargruppeneffekts und der destabilisierenden Wirkung der Carboxylgruppe vermehrt zu Eliminierungsprodukten führen. Balmond *et al.*<sup>[213]</sup> zeigten, dass elektronenreiche Glycale mit primären Alkoholen durch Katalyse eines Thioharnstoffs<sup>[214]</sup> **26** zu 2-Desoxy-

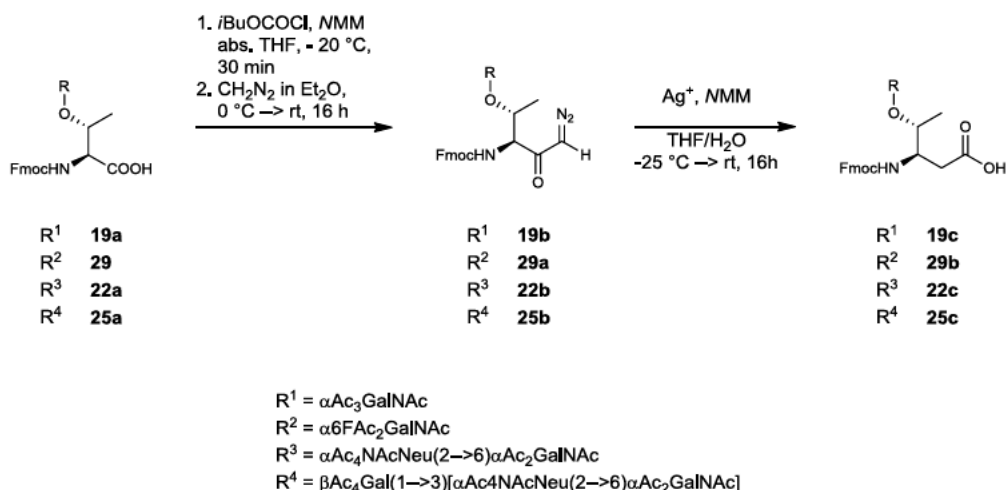
Sacchariden mit  $\alpha$ -Konfiguration reagieren können. Es wurde versucht, diese Methode auf das Glycal der *N*-Acetylneuraminsäure **14a** zu übertragen, das bei den beschriebenen Reaktionen mit 1-2 Äquivalenten als Nebenprodukt auftritt. Allerdings zeigten im Vergleich zu den in der Literatur<sup>[213]</sup> beschriebenen Reaktionen mit elektronenreichen Glycalen sowohl längere Reaktionszeiten, erhöhte Reaktionstemperaturen oder aber eine höhere Konzentration an Thioharnstoff **26** bis hin zu äquimolaren Mengen keinen Einfluss auf die Reaktivität des Sialinsäureglycals. Die Beobachtungen sind wahrscheinlich auf die elektronenarme Doppelbindung zurückzuführen.



Schema 4.15 Mechanismus der Addition von primären Alkoholen an elektronenreiche Glycale nach Balmond et al.

Die vorausgegangenen Abschnitte beschreiben die Herstellung verschiedener tumorassoziierter Kohlenhydratantigene, die für die nachfolgenden Reaktionen als Edukte dienen sollen. Die Darstellung der  $\beta^3$ -homo-Threoninkonjugate erfolgte für alle tumorassozierten Antigene nach einer veränderten Vorschrift von *Norgren, Norberg* und *Arvidson*<sup>[123]</sup> die bereits 2010 von *Karch et al.*<sup>[125]</sup> für den Aufbau eines Tn- und T-Antigenanalogons eingesetzt wurde. Hierzu wurden die freien Säuren in absolutem Tetrahydrofuran gelöst und unter Kühlung mit *N*-Methylmorpholin und Chlorameisensäure-*iso*-butylester aktiviert. Die Aktivester wurden anschließend mit einem Überschuss an Diazomethan in etherischer Lösung versetzt. Die so erhaltenen Diazoketone wurden einer silbersalzkatalysierten *Wolff*-Umlagerung unterworfen, wobei das entstehende Keten durch Wasser abgefangen wurde. Dabei dienten Silbertrifluoracetat und Silberacetat als Promotoren (Schema 4.16).



Schema 4.16 Darstellung der TACAs als  $\beta^3$ -homo-Threoninkonjugate

Das Acetatsalz zeigte in allen Versuchen minimal bessere Ausbeuten, was möglicherweise auf den basischeren Charakter des Acetats zurückzuführen ist ( $pK_a$  TFA = 0.23,  $pK_a$  AcOH = 4.76). Die Ausbeuten in Abhängigkeit von Silbersalz und Edukt zeigt Tabelle Tab. 1. Für die sialylierten Varianten lassen sich größere Verluste feststellen, was möglicherweise auf den Raumanspruch der Sialinsäure und die damit verbundene sterische Hinderung während der Umlagerung zurückzuführen ist.<sup>[130]</sup>

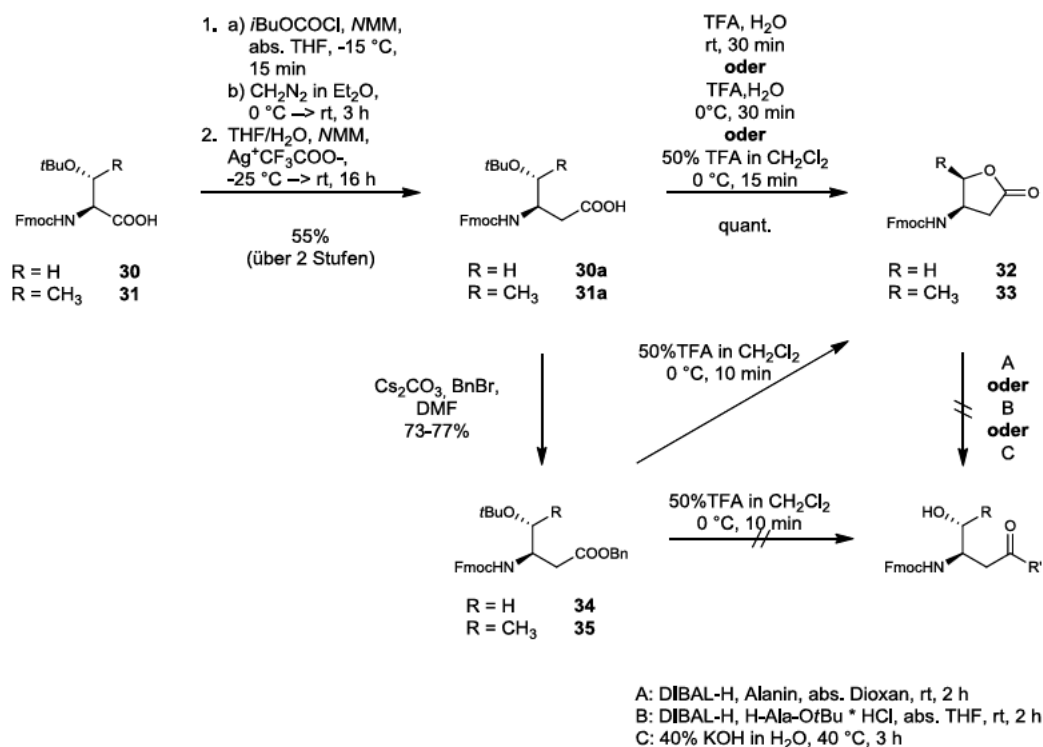
Eintrag	Glycokonjugat	Silbersalz	Produkt	Ausbeute
<b>1<sup>b</sup></b>	(1b)	AgOOCFF <sub>3</sub>	<b>(2b), Tn-Azid</b>	82%
<b>2<sup>b</sup></b>	(1a)	AgOOCFF <sub>3</sub>	<b>(2a), Tn-Acetamid</b>	60%
<b>3</b>	19a	AgOAc	<b>19c</b>	66%
<b>4</b>	29	AgOAc	<b>29b</b>	64%
<b>5</b>	22a	AgOOCFF <sub>3</sub>	<b>22c</b>	36%
<b>6</b>	22a	AgOAc	<b>22c</b>	38%
<b>7</b>	25a	AgOAc	<b>25c</b>	3%

Tab. 1 Ausbeuten der Arndt-Eistert-Homologisierung in Abhängigkeit von eingesetztem Glycokonjugat und Silbersalz.

Prinzipiell ist es riskoreich, die *Arndt-Eistert*-Reaktion erst im letzten Schritt durchzuführen. Es konnten nicht immer alle Ergebnisse reproduziert werden, obwohl die gleichen Chemikalien und Reaktionsbedingungen verwendet wurden. Geeigneter wäre es daher, den prozesskritischen Schritt am Anfang der Synthese durchzuführen und so einen Zugang zu orthognonal geschütztem  $\beta^3$ -homo-Threonin oder -Serin zu etablieren. Letztere können dann analog zu L-Threonin bzw. L-Serin im Aufbau der tumorassoziierten Antigene eingesetzt werden könnte. Aus diesem Grund wurde eine andere Syntheseroute eingeschlagen und zunächst Fmoc- und *tert*-Butylether geschütztes Serin **30** bzw. Threonin **31** einer *Arndt-Eistert*-Reaktion unterworfen. Der Versuch die Hydroxylgruppe unter sauren Bedingungen zu deblockieren, führte allerdings, wie bereits von *Norgren et al.* beschrieben, zur Bildung der  $\gamma$ -Butyrolactonderivate **32** und **33**, die nicht weiter

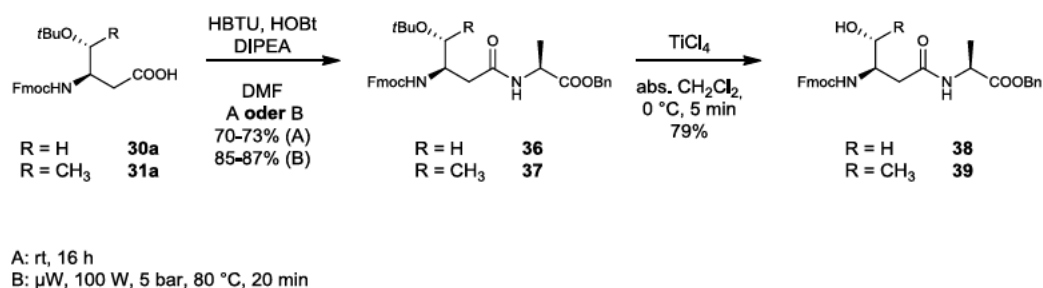
<sup>b</sup> (Verbindungsnummern) und Ausbeute analog zu *Beilstein J. Org Chem.* **2010**, 6, No.47.

verwertet werden konnte. Versuche, die Lactone **32** und **33** mit unterschiedlichen Alkoholen oder Aminen zu öffnen, führten nicht zum Erfolg. Auch die Blockierung der Carboxylgruppe nach der *Arndt-Eistert*-Reaktion als Benzylester (**34** und **35**), führte unter sauren Bedingungen zur Ausbildung der bereits bekannten Lactone (vgl. Schema 4.17).



Schema 4.17 Versuche zur Darstellung von orthogonal geschütztem  $\beta^3$ -homo-Serin und  $\beta^3$ -homo-Threonin.

Einzig die Synthese der Hybriddipeptide **36** und **37**, die den MUC1-Sequenzabschnitt Ser<sup>7</sup>-Ala<sup>8</sup> bzw. Thr<sup>18</sup>-Ala<sup>19</sup> entsprechen, konnte reaktionsträge Carbonsäurederivate liefern, die unter sauren Bedingungen nicht zu den Lactonen weiter reagierten, sondern sich selektiv an der Hydroxylgruppe mit Titan(IV)chlorid in absolutem Dichlormethan deblockieren ließen (vgl. Schema 4.18).<sup>[215]</sup> Die Reaktion lief innerhalb weniger Minuten vollständig ab.



Schema 4.18 Darstellung der Hybridpeptide **38** und **39**.

Der Versuch, die freien Alkohole **38** und **39** als Akzeptor zur Synthese eines glycosylierten Dipeptids einzusetzen, scheiterte allerdings (vgl. Schema 4.19). Reaktionen in Dichlormethan, Acetonitril oder Toluol und in Gemischen dieser führten zu keinen isolierbaren Produkten. Auch der Einsatz von unterschiedlichen Donoren und Promotoren führte zu keinem Ergebnis. Tabelle Tab. 2 fasst die Bedingungen für die in Schema 4.19 gezeigte Reaktion zusammen.



Schema 4.19 Glycosylierungsversuche an den Hybriddipeptiden **38** und **39**.

Eintrag	Akzeptor	Donor	Promotoren	Lösungs- mittel	Bedingung	Ausbeute
<b>1</b>	<b>38</b>		$\text{AgClO}_4 / \text{Ag}_2\text{CO}_3$	abs. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / abs. Toluol	rt, 14 h	nb
<b>2<sup>c</sup></b>	<b>38</b>		TMSOTf	abs. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	rt, 14 h	nb
<b>3</b>	<b>38</b>		$\text{Hg}(\text{CN})_2$	abs. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	100 W, 5 bar, 80 °C, 1 h	nb
<b>4</b>	<b>38</b>		$\text{Hg}(\text{CF}_3\text{COO})_2$	abs. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	100 W, 5 bar, 80 °C, 1 h	nb

Tab. 2 Reaktionsbedingungen beim Versuch das Hybriddipeptid **38** zu glycosylieren. Nb: nicht bestimmbar.

Derzeit erweist sich die *Arndt-Eistert*-Homologisierung auf der letzten Stufe als einzige Wahl für die Darstellung der  $\beta^3$ -homo-Threonin-Kongjugate.

<sup>c</sup> Das Trichloracetimidat wurde freundlicherweise von Sebastian Götze zur Verfügung gestellt.

## 4.4 Synthese von fluorierten $\beta^3$ -homo-Serinbausteinen

Eine andere Möglichkeit  $\beta^3$ -Aminosäuren darzustellen, beruht auf einer *de novo*-Synthese mit enantio- oder diastereoselektiven Einführung der Aminogruppe in der 3-Position. Dabei besteht gleichzeitig die Möglichkeit die  $\alpha$ -Position zu funktionalisieren (Einführung von OH-Gruppen, Alkylierung, Fluorierung etc.). Ein Fluorsubstituent in der 2-Position sollte zwar zu keiner Destabilisierung führen, wie bereits in Abschnitt 2.3.2 erläutert wurde, allerdings ist eine weitere Stabilisierung und damit eine Verstärkung des  $\beta$ -Aminosäureeffekts auf die Struktur des Peptids oder Stabilität der Peptidbindung nicht auszuschließen. *Corinna Jansen*<sup>d</sup> konnte inzwischen zeigen, dass der Einbau von fluorierten Prolinen in der MUC1-Sequenz durchaus zu einer Stabilisierung gegenüber Enzymen führen kann. Des Weiteren können fluorierte Substrate für Bindungsstudien genutzt werden.<sup>[216-217]</sup> In der Literatur werden zum Aufbau eines (3*S*)- $\beta^3$ -homo-Serinderivats zwei Wege verfolgt.<sup>[218]</sup> Beide generieren aus Ethylenglykol monogeschützte Alkohole, die zu den entsprechenden Aldehyden oxidiert werden. Letztere reagieren schließlich in einer *Horner*-Reaktion zu  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Estern, die einer enantioselektiven *Aza-Michael*-Reaktion<sup>[219-224]</sup> unterworfen werden. Als Schutzgruppen werden in der Literatur *tert.*-Butyldimethylsilyl- und Benzylether gewählt, die Vor- und Nachteile aufweisen:

1. Benzylether:

- Vorteil: Hohe Ausbeute bei der Synthese des Alkens.
- Nachteil: Niedrige Ausbeute bei der *Aza-Michael*-Reaktion mit hohem *ee*.

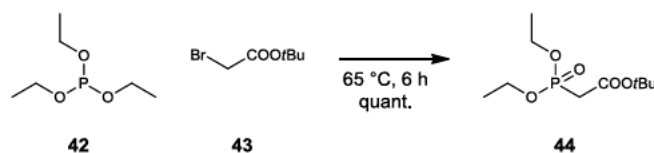
2. TBDMS-Ether:

- Vorteil: Hohe Ausbeute und hoher *ee* bei der *Aza-Michael*-Reaktion.
- Nachteil: Niedrigere Ausbeute bei der Synthese des Alkens.

Zur Herstellung des fluorierten  $\beta^3$ -homo-Serinderivats **55** wurden beide Syntheserouten parallel verfolgt. Die Route über den benzylgeschützten Alkohol bietet in der späteren Schutzgruppenmanipulation die Möglichkeit, Amin und Alkohol parallel zu deblockieren, während der TBDMS-Ether in einem gesonderten Schritt zu spalten ist. Zur Darstellung der *Michael*-Systeme<sup>[225-226]</sup> **50** und **51** in einer *Horner*-Reaktion<sup>[227]</sup> wurde zunächst das Phosphonat **44** ausgehend von Tri-*O*-Ethylphosphit **42** und 2-Brom-essigsäure-*tert.*-butylester **43** in einer *Michaelis-Arbuzov*-Reaktion<sup>[228-231]</sup> synthetisiert (Schema 4.20).

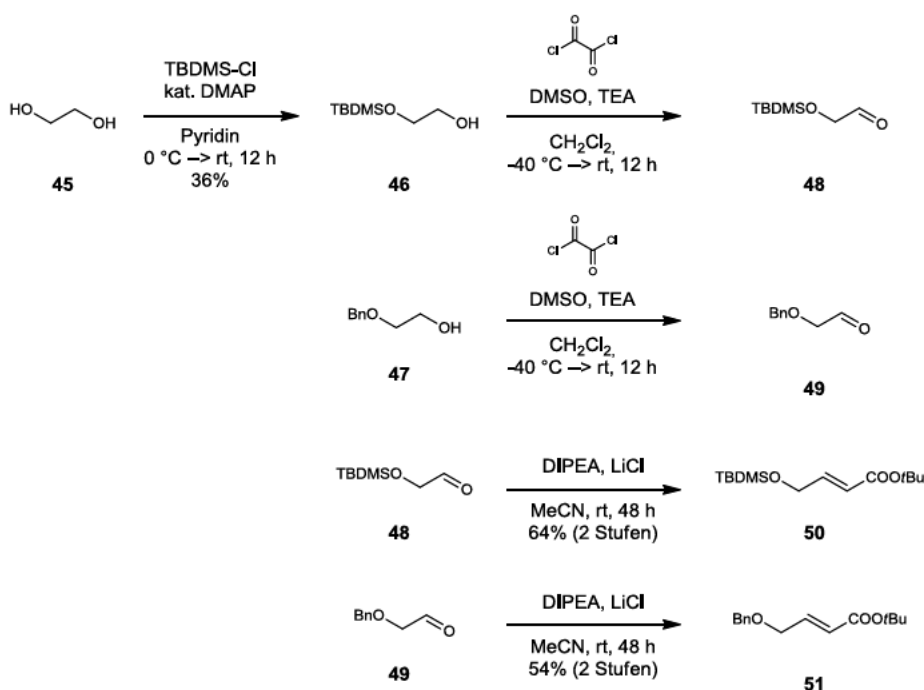
<sup>d</sup> Mitteilung in einem persönlichen Gespräch.





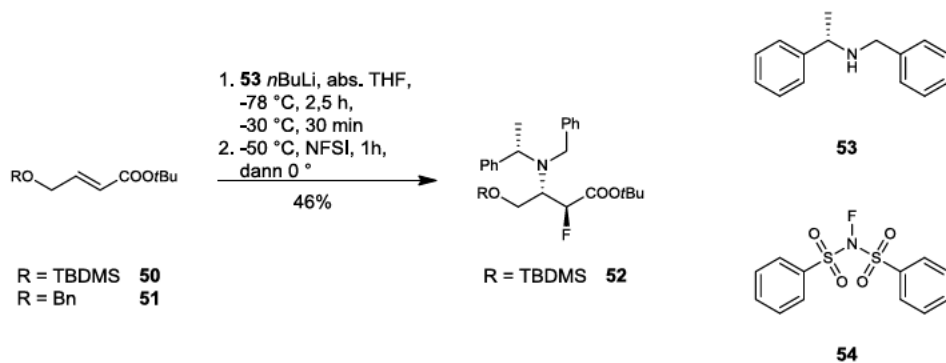
Schema 4.20 Darstellung des Phosphonats **44** in einer Michaelis-Arbuzov-Reaktion.

Zur Synthese der für die Horner-Reaktion benötigten Aldehyde wurde Ethylenglycol **45** mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl) zum einfach geschützten Alkohol **46** umgesetzt. Letzterer und das kommerziell erhältliche mono-benzylethergeschützte Ethylenglycol **47** wurden in einer Swern-Reaktion<sup>[232]</sup> zu den Aldehyden **48** und **49** oxidiert, die ohne Reinigung mit Phosphonat **44** zu den (*E*)- $\alpha,\beta$ -ungesättigten Estern **50** und **51** umgesetzt wurden. Die Ausbeuten betrugen 23% (3 Stufen) und 54% (2 Stufen) für die TBDMS- bzw. benzylgeschützten Michael-Systeme.



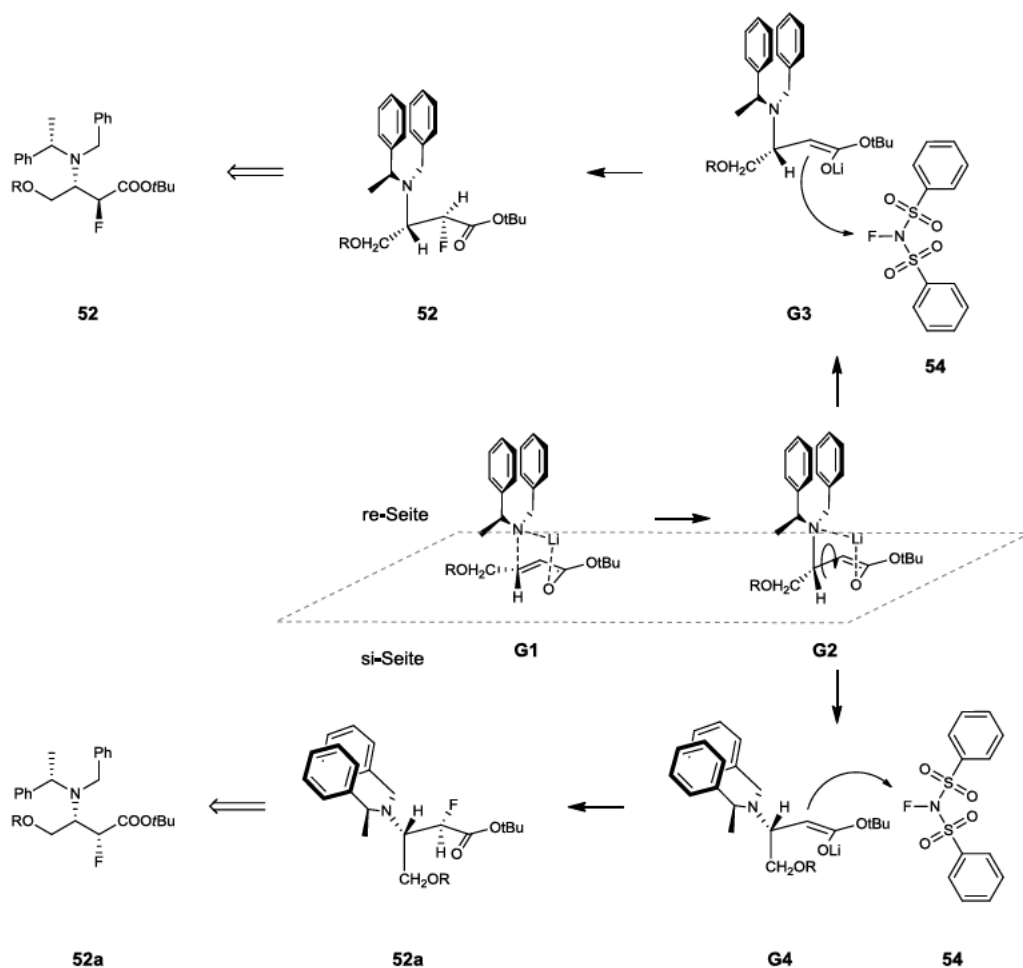
Schema 4.21 Darstellung der Michael-Systeme **50** und **51**.

Die enantioselektive Addition des chiralen Amins **53** an die  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ester mit einem anschließenden diastereoselektiven Abfangen der Carbanionen **50a** und **51a** durch das elektrophile Fluorierungsreagenz *N*-Fluor-benzosulfonimid (NFSI) **54** führte nur bei Ester **50** zum gewünschten Produkt **52** (Schema 4.22).<sup>[233]</sup> Der benzylgeschützte Ester **51** führte zu einem Gemisch aus Zersetzungsprodukten, die nicht näher charakterisiert werden konnten.



Schema 4.22 Synthese des 2F-β<sup>3</sup>-homo-Serin **52**.

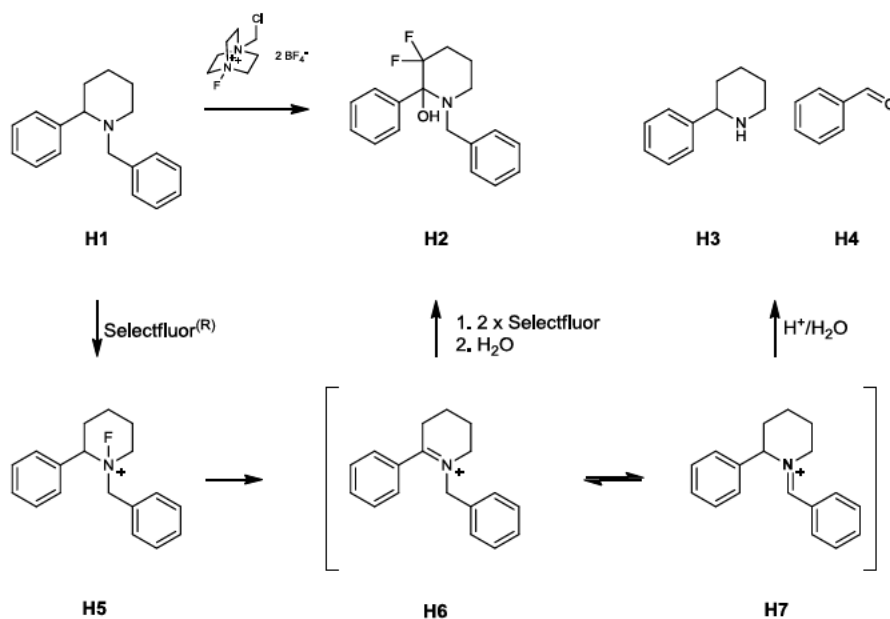
Der Aufbau des (3*R*)-Zentrums wird durch die Methylgruppe im (*S*)-(-)-*N*-Benzyl-α-Methylbenzylamin kontrolliert. Der Übergangszustand wird durch das Lithiumion stabilisiert, wie es in Schema 4.23 gezeigt ist.<sup>[224]</sup> Es konnte sowohl die Bildung des anti-Produkts (Hauptprodukt, **52**) als auch des syn-Produkts **52a** beobachtet werden, wenngleich die anti-Addition deutlich überwog (dr: 97:3 zugunsten des *anti*-Produkts).



Schema 4.23 Mechanismus der enantioselektiven Amidaddition und der diastereoselektiven Fluorierung mit NFSI.

Möglicherweise wird das Lithiumchelate **G1** gelöst und es kommt anschließend zu einer Rotation um die C2-C3-Achse **G2**. Aus dieser Position wäre eine Addition von der weniger begünstigten re-Seite denkbar **G4**. In beiden Fällen entstand nach der wässrigen

Aufarbeitung der Reaktion Benzaldehyd, der sowohl durch den charakteristischen Geruch als auch durch NMR-Signale identifiziert werden konnte. Mitarbeiter der *Merck AG* konnten 2011 zeigen, dass bei benzylierten Aminen die Reaktion mit Selectfluor<sup>®</sup> zu einer oxidativen Bildung eines Imins **H7** führen kann, dessen Hydrolyse ebenfalls zu Benzaldehyd **H4** führte. Weiterhin konnten sie zeigen, dass es an der von Merck gezeigten Struktur zu einer zweiten Reaktion kommen kann, die zu einem geminalen Difluorid **H2** führte (vgl. Schema 4.24).<sup>[234]</sup>



Schema 4.24 Von Merck postulierter Mechanismus zu Benzaldehydspaltung und Bildung des geminalen Difluorids.

Betrachtet man die chemische Verschiebung für  $\text{CF}_2\text{H}$ -Gruppen und ferner die  $^2\text{J}(\text{F},\text{F})$ -Kopplung für verschiedene Verbindungen, so stellt man fest, dass diese im Bereich von ca. -120 bis -130 ppm liegen und eine Kopplungskonstante von etwa 280 Hz aufweisen.<sup>[235-236]</sup> Im Produkt konnte ebenfalls eine weitere Komponente im  $^{19}\text{F}$ -Spektrum nachgewiesen werden, deren chemische Verschiebung bei etwa -110 ppm lag und eine Kopplung von 260 Hz aufwies. Dies ist zwar kein Beweis für eine ebenfalls oxidative Reaktion mit NFSI, dessen Oxidationspotential deutlich unter dem von Selectfluor<sup>®</sup> liegt (0.33 V für Selectfluor<sup>®</sup> und -0.54 V für NFSI),<sup>[237-238]</sup> doch lassen das Auftreten von Benzaldehyd, die chemische Verschiebung der auftretenden Fluorsignale und deren große Kopplungskonstante, eine solche Reaktion vermuten. Der postulierte Mechanismus zur Bildung des Benzaldehyds aus dem fluorierten  $\beta^3$ -homo-Serinderivat **52** ist in Schema 4.26 dargestellt. Zum einen kann die Übertragung von Fluor auf den Stickstoff und eine anschließende HF-Eliminierung zum Imin **I3** oder **I2** führen. Letzteres kann bei saurer wässriger Aufarbeitung zu Benzaldehyd **I4** und Amin **I5** hydrolysiert werden. Die konkurrierende Reaktion, die zum geminalen Difluorid **I6** führt, könnte ebenfalls Acetophenon **I8** freisetzen, was allerdings nicht beobachtet werden konnte.



## 4.5 Synthese PNA-ähnlicher Glycoverbindungen

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Darstellung von TACA-Analoga basierend auf  $\alpha$ -N-Acyl-N-Aminoethyl-Peptid-Bausteinen. Genauer wird die Synthese von PNA-ähnlichen Strukturen betrachtet. Dabei wird der Abstand der Kohlenhydrate zum Rückgrat durch die Kettenlänge der verknüpfenden  $\omega$ -Hydroxycarbonsäure bestimmt.

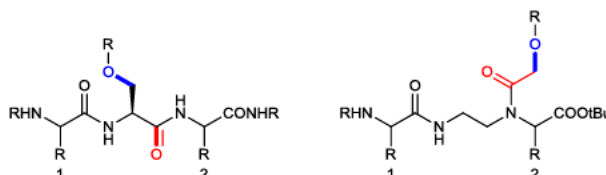
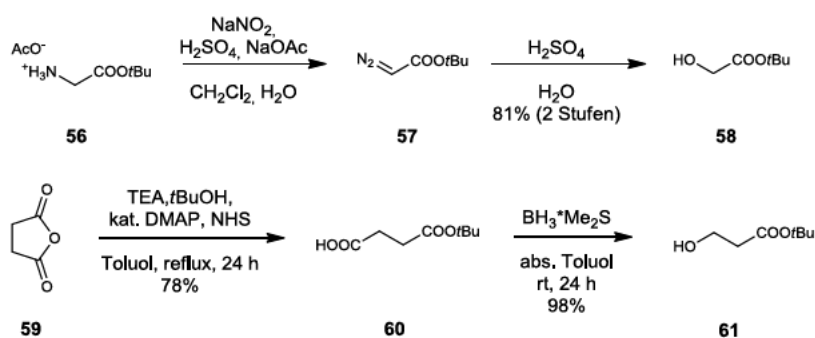


Abb. 4.2 Vergleich der  $\alpha$ -Peptid- mit den AAP-Strukturelementen.

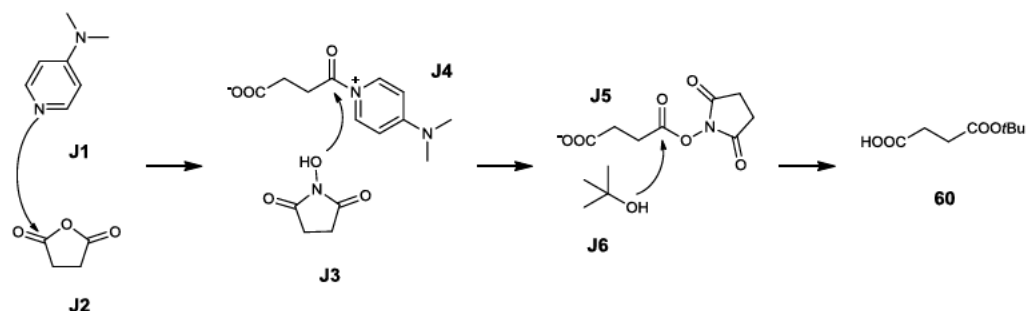
Zur Herstellung der analogen C2- bzw. C4-Akzeptoren **58** und **61** wurde zunächst Glycintert.-butylester Hydroacetat **56** nach einer Methode von Müller und Huber-Emden<sup>[167]</sup> mit Natriumnitrit diazotiert, bevor das Diazoniumsalz **57** in verdünnter Schwefelsäure zur 2-Hydroxyessigsäure **58** hydrolysiert wurde. Für das  $\gamma$ -Hydroxybuttersäureanalogon **61** wurde zunächst Bernsteinsäureanhydrid **59** mit tert.-Butanol unter Bildung des Monoesters **60** geöffnet. Der Monoester **60** wurde mit Boran-Dimethylsulfid-Komplex in THF zum  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure-tert.-butylester **61** reduziert (vgl. Schema 4.27).<sup>[168, 239]</sup>



Schema 4.27 Darstellung von Hydroxyessigsäure- und  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure-tert.-butylester **58** und **61**.

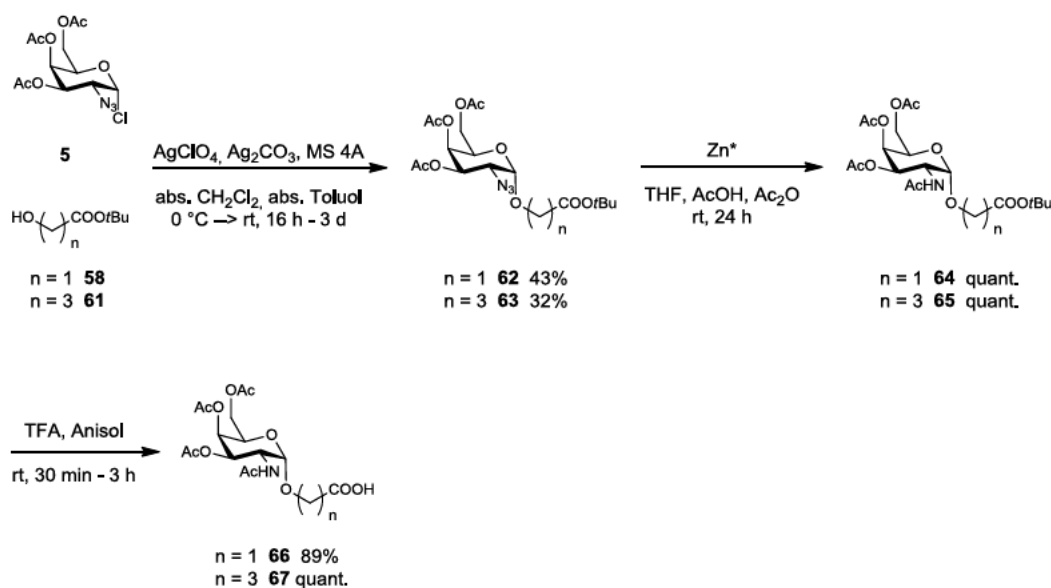
Der Mechanismus der Ringöffnung, der unter DMAP-Katalyse verläuft, ist in Schema 4.29 gezeigt. Dabei reagiert das Anhydrid **59** analog einer *Steglich*-Veresterung<sup>[240]</sup> zunächst mit DMAP und bildet den Aktivester **J4**, der mit NHS zu einem weiteren Aktivester **J5** reagiert. Letzterer wird durch tert.-Butanol unter Bildung des Monoesters **60** abgefangen.





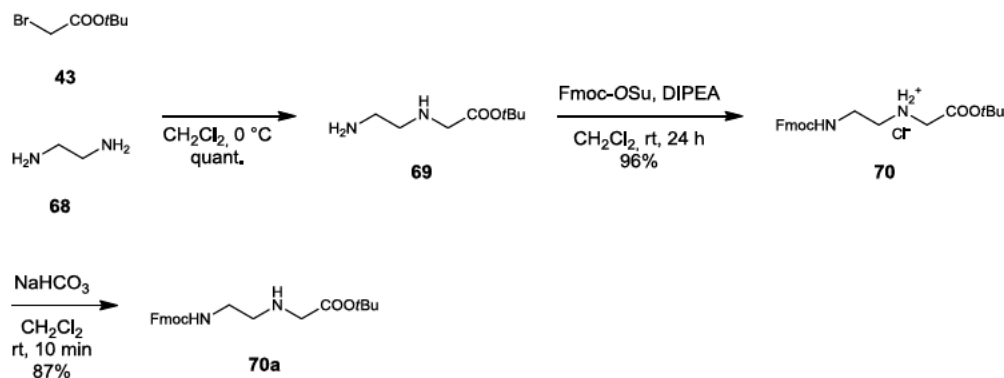
Schema 4.29 Mechanismus der mono-Veresterung zu Verbindung 60.

Die Konjugation der  $\omega$ -Hydroxycarbonsäuren **58** und **61** an Azidochlorid **5** erfolgte unter den bereits beschriebenen *Königs-Knorr*-Bedingungen nach einer Variante nach *Paulsen* und *Hölk*<sup>[196]</sup> aus Abschnitt 4.3. Dabei konnten die Glycokonjugate **62** und **63** in Ausbeuten von 43% und 32% erhalten werden. Die Reduktion der Azidfunktion unter gleichzeitiger Acetylierung zu den *N*-Acetyl-galactosyl-Derivaten **64** und **65** erfolgte ebenfalls nach der bereits beschriebenen Methode mit aktiviertem Zink in einer Mischung aus Tetrahydrofuran, Essigsäure und Essigsäureanhydrid. Die anschließende Deblockierung der Carboxylfunktion mit Trifluoressigsäure und Anisol als Kationenfänger führte zu den freien Säuren **66** und **67**, die zur Kupplung an das Rückgrat dienten. Dabei erhielt man die besten Kupplungsergebnisse, wenn man die freie Säure nicht an Kieselgel reinigte, sondern wenn man sie als Rohprodukt direkt weiter einsetzte.



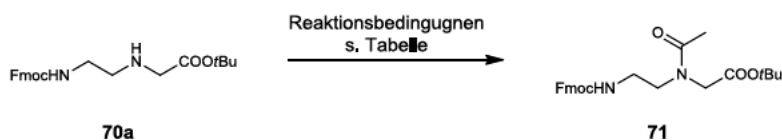
Schema 4.28 Herstellung der glycosylierten  $\omega$ -Hydroxycarbonsäuren **66** und **67**.

Die Synthese des Rückgrat-Bausteins **70** erfolgte ausgehend von 2-Brom-essigsäure-*tert.*-butylester (**43**) mit Ethylendiamin **68** in einer nucleophilen Substitution zum freien Amin **69**, welches mit Fmoc-OSu zum orthogonal geschützten sekundären Amin reagierte, das aus Chloroform als Hydrochlorid **70** auskristallisiert werden konnte (Schema 4.30).



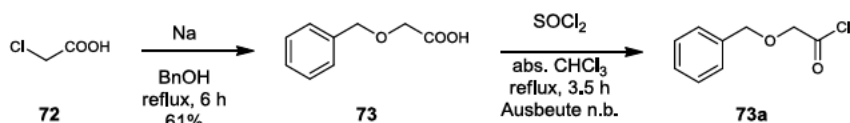
Schema 4.30 Darstellung des Rückgrat-Bausteins **70** und des freien Amins **70a**.

Das Hydrochlorid **70** diente nicht nur als Kupplungspartner für die Darstellung der TACA-Analoga **75** und **76**, sondern auch zur Synthese der Aminosäureanaloga Alanin **71a** und Serin **74a** auf Basis der PNA-Strukturelemente, die später zur Darstellung erster Modellpeptide für die Entwicklung eines geeigneten Screenings dienen sollten. Zur Synthese des Alaninanalogons **71** wurde zunächst versucht, das deprotonierte Amin **70a** in *N,N*-Dimethylformamid mit Essigsäureanhydrid und *Hünigs*-Base zu acetylieren. Die von Challa *et al.*<sup>[241]</sup> gefunden Ausbeuten konnten nicht reproduziert werden. Stattdessen erhielt man die beste Ausbeute von 41% für Verbindung **71** mit dem freien Amin **70a** für die Kupplung in *N,N*-Dimethylformamid, mit *Hünigs*-Base und unter DMAP-Katalyse.



Schema 4.31 Acetylierung des freien Amins **70a** unter verschiedenen Reaktionsbedingungen.

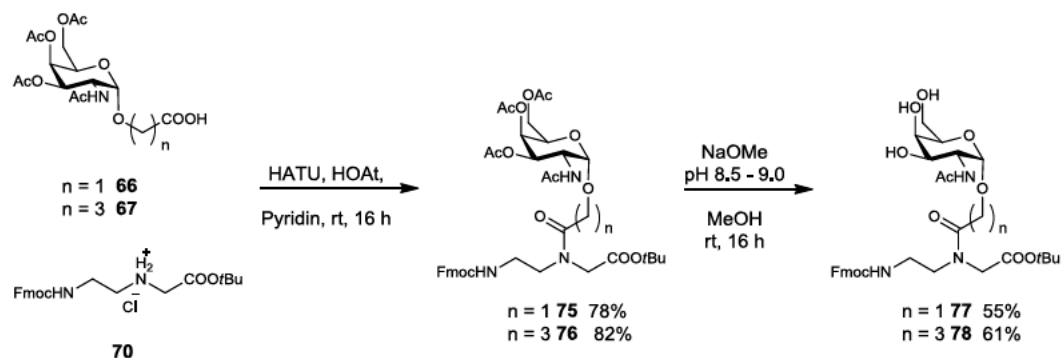
Für das Serinderivat **74** wurde 2-Chloressigsäure (**72**) mit Natriumbenzylat in Benzylalkohol zur 2-Benzyloxyessigsäure (**73**) umgesetzt. Der so erhaltene Benzylether ist kompatibel zu den bereits eingeführten orthogonalen Fmoc- und *tert.*-Butyl-Schutzgruppen. Die Kupplung an den Rückgrat-Baustein **70a** erfolgte ebenfalls unter unterschiedlichsten Reaktionsbedingungen. Zum besten Ergebnis führte eine Kombination aus HATU und HOAt mit *Hünigs*-Base in *N,N*-Dimethylformamid. Eine deutliche Verbesserung der Ausbeuten trat ein, wenn man statt des freien Amins **70a** das entsprechende Hydrochlorid **70** direkt in der Kupplung einsetzte. Als Lösungsmittel und Base diente hierbei Pyridin (vgl. Tab. 3).



Schema 4.32 Darstellung der Benzyloxyessigsäure **73a**.



Die Glykokonjugate **75** und **76** konnten ausgehend von Hydrochlorid **70** und mit den Kupplungsreagenzien HATU/HOAt in einer Ausbeute von bis zu 80% synthetisiert werden, während mit HBTU/HOBt als Kupplungsreagenzien nur etwa 30% erreicht werden konnten (vgl. Schema 4.33)



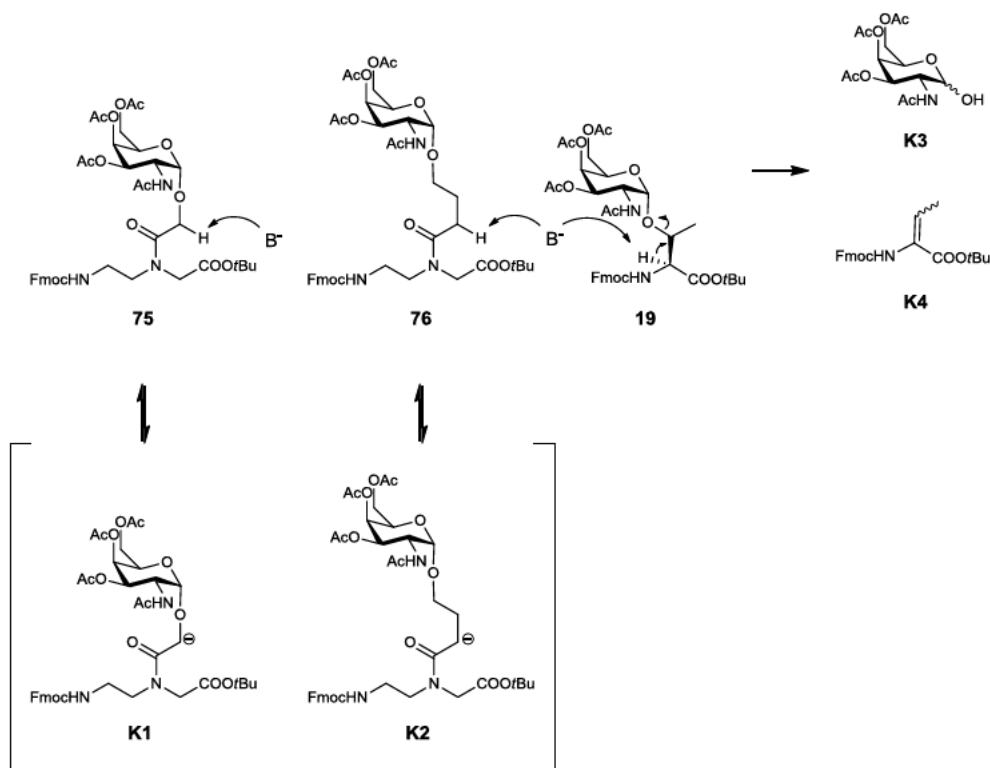
Schema 4.33 Synthese der Tn-Analoga **77** und **78** als AAP-Bausteine.

Eintrag	Säure	Amin	Reagenz	Base	Lösungsmittel	Ausbeute
1		70a	Ac <sub>2</sub> O	DIPEA	DMF	nb
2		70a	Ac <sub>2</sub> O		Pyridin	nb
3		70a	Ac <sub>2</sub> O	DIPEA	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	nb
4		70a	AcCl	DIPEA	DMF	nb.
5		70a	AcCl		Pyridin	nb.
6		70a	Ac <sub>2</sub> O	DIPEA	DMF	41%.
7	73	70a	HBTU/HOBt	DIPEA	DMF	0%
8	73	70a	HBTU/HOBt	DIPEA	DMF	0%
9	73	70a	HBTU/HOBt	NMM	DMF	0%
10	73a	70a		NMM	CHCl <sub>3</sub>	19%
11	73	70a	HATU/HOAt	DIPEA	DMF	31%
12	66	70	HBTU/HOBt		Pyridin	29%
13	66	70	DCC		Pyridin	nb
14	66	70	HATU/HOAt		Pyridin	78%
15	67	70	HATU/HOAt		Pyridin	82%

Tab. 3 Kupplungsbedingungen zur Synthese der αAA-Peptidbausteine. nb: nicht bestimmbar

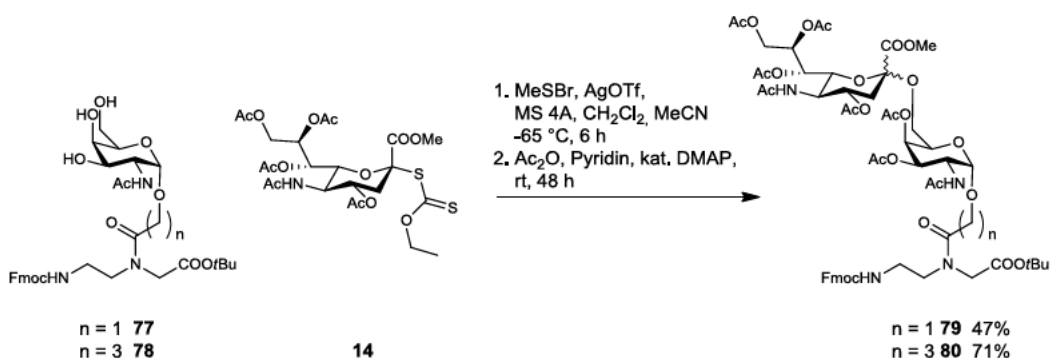
Die Glykokonjugate **75** und **76** konnten, wie in Tab. 3 gezeigt, in guten Ausbeuten erhalten werden. Um auch Analoga der übrigen TACAs darzustellen, wurden letztere in einer modifizierten Zemplén-Veresterung<sup>[158, 197]</sup> mit Natriummethanolatlösung analog der Synthese des freien Tn-Derivat **20** deblockiert. Der pH-Wert sollte für diese Verbindungen bis auf einen möglichen Verlust der Fmoc-Gruppe keine Rolle spielen, da im Fall der C2- bzw. C4-Ketten keine β-Eliminierung und damit kein Verlust der Kohlenhydratreste auftreten kann (Schema 4.34). Dennoch wurde der pH-Wert unter

ständiger Kontrolle auf pH 8.5-9.5 eingestellt. Die Reaktionsmischung wurde, wie bereits für das Tn-Antigen beschrieben, ebenfalls nach der Aufarbeitung mit 10-20mol% Fmoc-OSu versetzt, um einer niedrigen Ausbeute durch einen Fmoc-Verlust vorzubeugen.



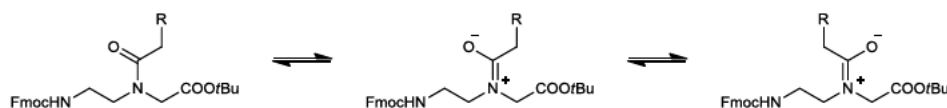
Schema 4.34 Basenstabilität der  $\alpha$ AAP-Bausteine und  $\beta$ -Eliminierung bei Threoninkonjugaten

Die deblockierten Tn-Analoga **77** und **78** wurden anschließend in einer Glycosylierung mit Xanthogenat **14** in die entsprechenden sTn-Antigenanaloga **79** und **80** überführt (Schema 4.35). Die Wahl des Xanthogenats **14** ist auf eine unvollständige hydrogenolytischen Spaltung des Benzylesters beim sTn-Analogen zurückzuführen. Der eingesetzte Methylester soll daher zeitgleich mit den vorhandenen Acetylschutzgruppen in wässriger Natriumhydroxidlösung gespalten werden.



Schema 4.35 Herstellung der sTn-Antigenanaloga **79** und **80** auf PNA-Basis.

Die NMR-Spektren der Glycosylierungsreaktionen zeigten eine Mehrzahl an Produkten, welche durch HPLC (Luna, H<sub>2</sub>O/MeCN, 40% – 60% – 100%) getrennt werden konnten. Während die Tn-Analoga auf PNA-Basis Signalverbreiterungen im NMR zeigten, so handelt es sich bei den sTn-Analoga um je zwei stabile Rotamere pro  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycosid, welche möglicherweise durch den räumlichen Anspruch der Kohlenhydratreste und der Fmoc- und *tert*.-Butylester-Schutzgruppen zustande kommen und durch den partiellen Doppelbindungscharakter des sekundären Amids stabilisiert werden (vgl. Schema 4.36).



Schema 4.36 Gleichgewicht zwischen stabilen Rotameren aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Amidbindung.

Gemäß der *Karplus*-Beziehung konnten anhand der HMBC-Spektren die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycoside eindeutig unterschieden werden (vgl. Abb. 4.3).

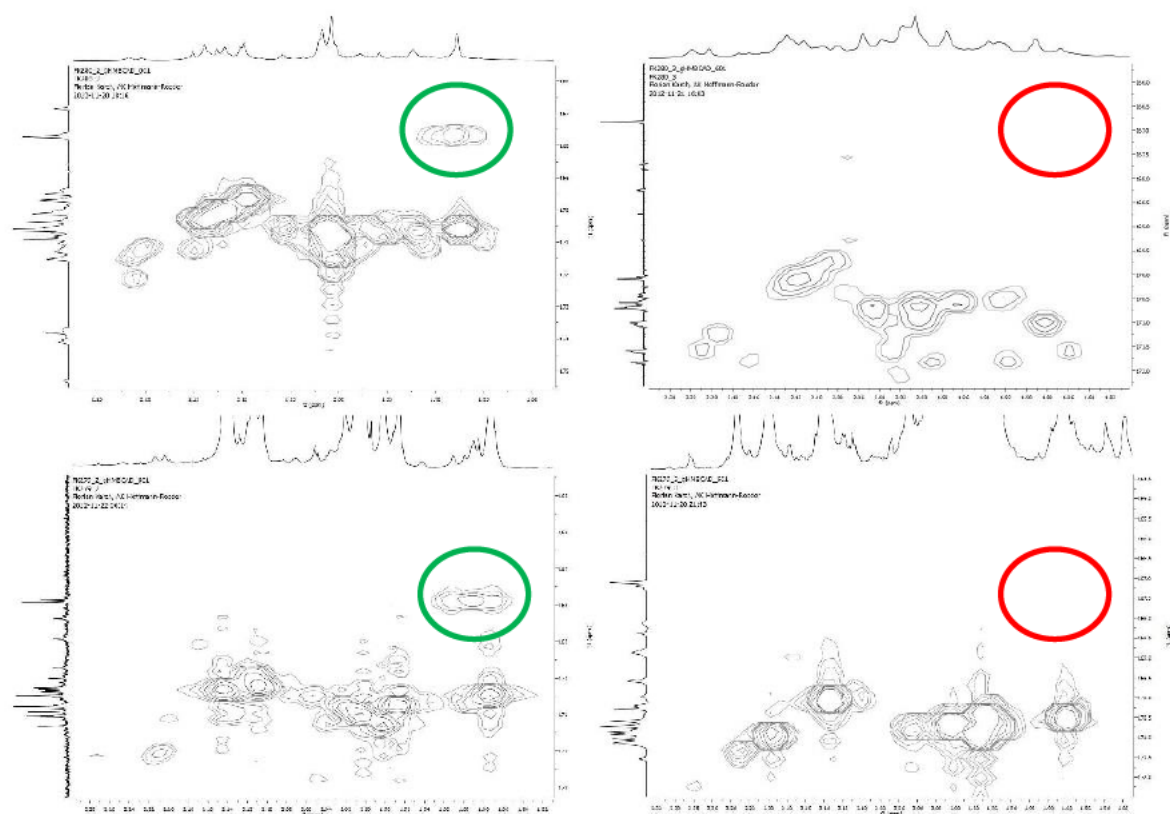
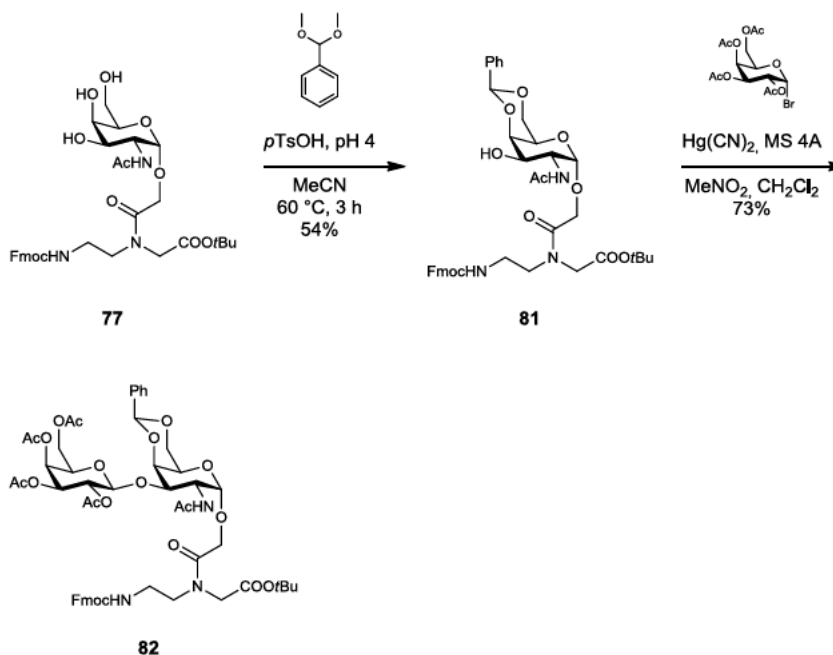


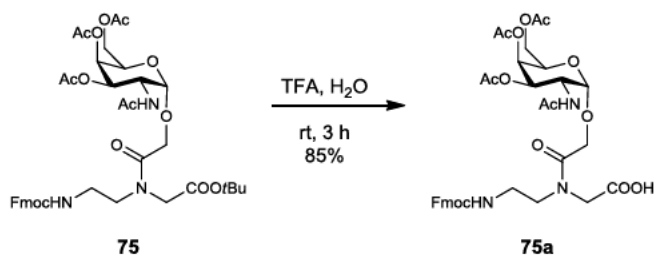
Abb. 4.3 Vergleich der HMBC-Spektren der sTn-Analoga **79** (oben) und **80** (unten). *Links*: Korrelation zwischen Sia-H3ax und Sia-C1. *Rechts*: Fehlender Kreuzpeak ( $\beta$ -Glycosid)

Die Darstellung eines T-Antigenanalogons **82** erfolgte ebenfalls nach der in Abschnitt 4.3 beschriebenen Prozedur. Hierfür wurde das deblockierte Tn-Analogon **77** mit Benzaldehyddimethylacetal in Acetonitril unter Säurekatalyse zum 4,6-Benzyliden-geschützten Tn-Analogon **81** umgesetzt. Letzteres reagierte mit Acetylbromid **3** in einer *Helferich*-Reaktion mit Quecksilber(II)cyanid als Promotor zum T-Analogon **82** (Schema 4.37).



Schema 4.37 Synthese des T-Analogons **82** in einer Helferich-Glycosylierung.

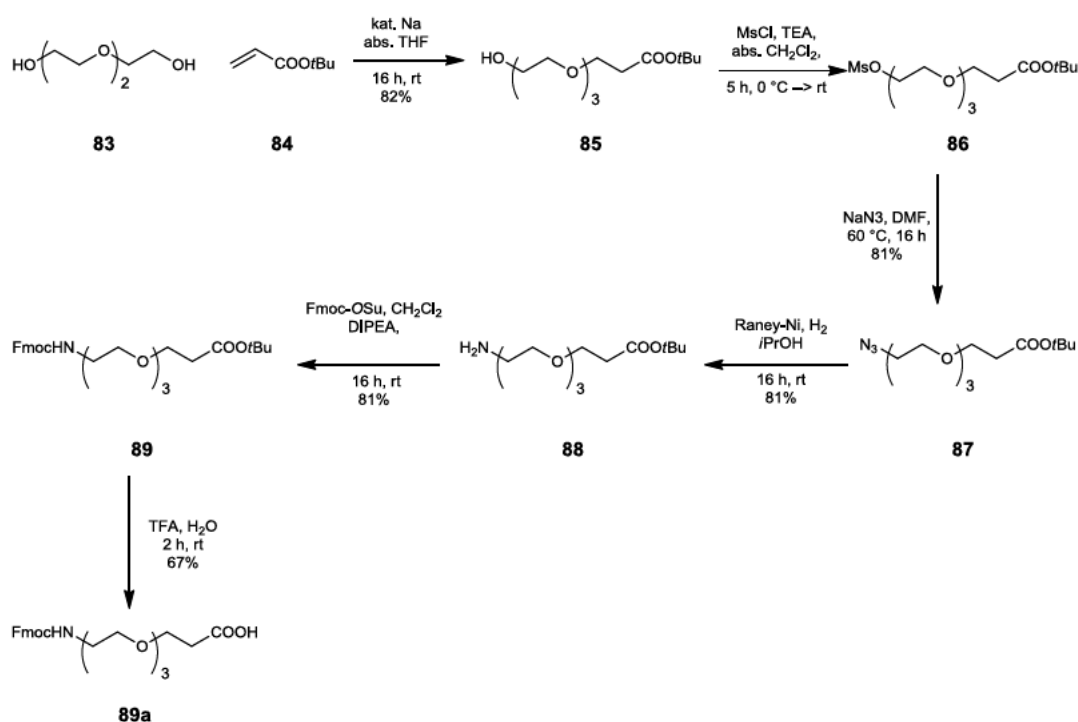
Die Darstellung des Festphasenbausteins **75a** erfolge analog der Methoden, die in den vorausgehenden Abschnitten schon für die Deblockierung der Carbonsäure in den Tn-, sTn- und sT-Antigenanaloga Anwendung fanden (Schema 4.38).



Schema 4.38 Darstellung des Festphasenbausteins **75a**.

## 4.6 Synthese eines nicht-immunogenen Linkers

Zur späteren Anbindung der Peptidpitope an einen immunogenen Carrier wie z.B. BSA oder Tetanus Toxoid wurde ein nicht-immunogener Linker **89a** nach einem Protokoll von *Seitz und Keil et al.* synthetisiert.<sup>[44, 242]</sup> Dieser verhindert, dass sich beide Haptene (Glycopeptid und Carrierprotein) gegenseitig in ihrer Konformation und in ihren immunologischen Eigenschaften beeinflussen. Hierzu wurde Triethylenglycol **83** mit katalytischen Mengen Natrium in einer *Oxa-Michael-Reaktion*<sup>[243-244]</sup> an Acrylsäure-*tert.*-butylester **84** addiert.<sup>[242]</sup> Der endständige Alkohol **85** wurde zunächst ins Mesylat **86** überführt und schließlich mit Natriumazid in DMF zum endständigen Azid **87** umgesetzt. Letzteres konnte in einer heterogen katalysierten Reaktion mit Raney-Nickel unter Wasserstoffatmosphäre zum entsprechenden Amin **88** reduziert werden. Die Reaktion mit Fmoc-OSu führte schließlich zum vollständig geschützten Linker **89**,<sup>[44]</sup> der mit TFA in einen geeigneten Festphasen-Baustein **89a** überführt wurde (Schema 4.39).



Schema 4.39 Synthese des nicht-immunogenen Triethylenglycol-Linkers **89a**.

## 4.7 Synthese von (Glyco)peptiden aus der tandem repeat-Domäne des epithelialen Mucins MUC1

Um Mikroheterogenitäten in Glycosylierungsmuster und Peptidzusammensetzung auszuschließen und die Wirksamkeit potenzieller Antigene zu untersuchen, müssen Glycopeptide des humanen Mucins MUC1 an fester Phase dargestellt werden. Neben der bereits genannten Homogenität spielen auch die rasche Verfügbarkeit und gezielte Modifikationsmöglichkeiten eine entscheidende Rolle. Die nachfolgenden Abschnitte beschreiben die Peptidsynthesen allgemein und stellen dabei vergleichend zwei Peptidsynthesizer einander gegenüber.

### 4.7.1 Allgemeines zur Peptidsynthese

Sämtliche Peptid- und Glycopeptidsynthesen wurden an fester Phase durchgeführt. Die Synthesen erfolgten automatisch für Peptide ohne synthetisierte Festphasenbausteine und halbautomatisch mit veränderten Kupplungsbedingungen für Peptide, die zuvor dargestellte Bausteine enthielten. Zur Synthese konnten ein *ABI 433A-Synthesizer* der Fa. *Applied Biosystems*, Foster City, oder ein *Liberty1*-Peptidsynthesizer der Fa. *CEM*, Matthews, herangezogen werden. Die wesentlichen Unterschiede der beiden Geräte werden nachfolgend aufgeführt:

#### 1. ABI 433A:

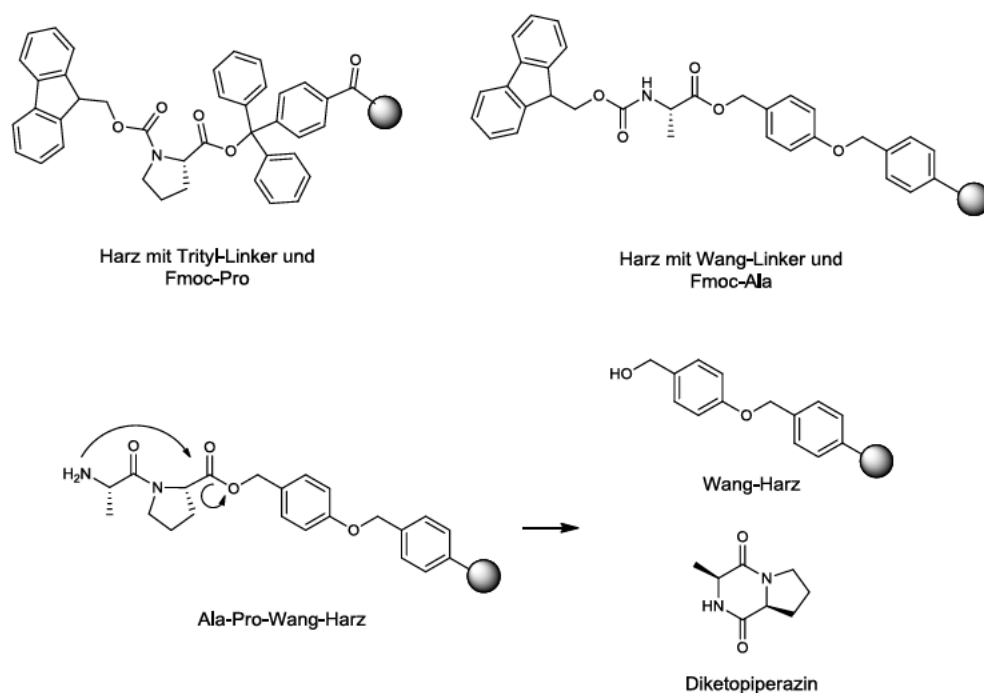
- Reaktionen bei Raumtemperatur.
- Zyklus für eine Aminosäure ca. 1 h (Kupplungszeit etwa 20-30 min).
- Programmierter Ablauf kann während der Synthese nicht verändert werden.
- Aminosäuren müssen einzeln eingewogen und richtig positioniert werden (10 Äquivalente/Kupplungsschritt)
- Geeignet für alle Harze.

#### 2. CEM Liberty1:

- Reaktionen bei erhöhter Temperatur durch Mikrowellenstrahlung (Standard) oder Raumtemperatur.
- Zyklus für eine Aminosäure ca. 30 min (Kupplungszeit 5-10 min).
- Programmierter Ablauf kann jederzeit für jede Aminosäure einzeln geändert werden (freie Parameterwahl).
- Aminosäuren werden einmalig eingewogen und in gelöster Form in der richtigen Dosierung in den Reaktor gepumpt (5 Äquivalente/Kupplungsschritt)
- Harze mit Trityl-Linker können zu niedrigen Ausbeuten führen; Chlortrityl-Linker können gar nicht eingesetzt werden.



Die Peptidsynthesen erfolgten nach der *Fmoc*-Strategie ausgehend von einem über einen geeigneten Linker mit der Startamino­säure funktionalisierten Harz.<sup>[245]</sup> Als Harze dienten für die Synthesen am *ABI 433A* die mit *Fmoc*-Pro beladenen und über einen säurelabilen Trityl-Linker<sup>[246-247]</sup> an die feste Phase gebunden TentaGel-Harze der Fa. *Rapp Polymere*, Freiburg. Die Synthesen in der *Liberty1* erfolgten ausgehend von einem mit *Fmoc*-Ala vorbeladenen und über einen ebenfalls säurelabilen Wang-Linker<sup>[248]</sup> an die feste Phase gebunden Harz der Fa. *NovaBiochem*, Darmstadt. Der Wechsel von der Aminosäure Prolin auf Alanin erfolgte als Konsequenz auf den Wechsel des Linkers, um eine mögliche Diketopiperazinbildung<sup>[249]</sup> unter den gegebenen Kupplungsbedingungen zu vermeiden (vgl. Schema 4.40).



Schema 4.40 Schematische Darstellung der Harze mit Trityl- und Wang-Linker. Mechanismus der Diketopiperazinbildung.

Alle Harze wurden mit niedriger Beladung gewählt, um eine Aggregation der wachsenden polaren Peptide zu vermeiden. Hier zeigt sich ein weiterer positiver Aspekt bei der Verwendung der *Liberty1* und der Mikrowellenstrahlung, die dazu führt dass sich die wachsenden Peptidstränge mit ihren Amidbindungen als Dipolen linear entlang der elektromagnetischen Welle ausrichten (vgl. Abb. 4.4.)<sup>[250]</sup>



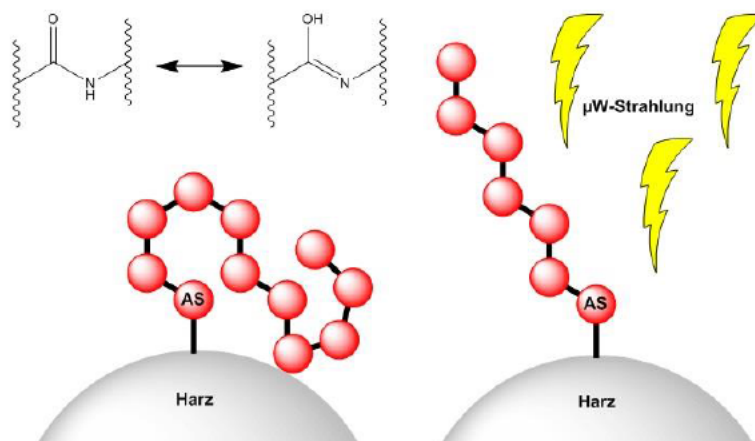


Abb. 4.4 Schematische Darstellung des Einflusses der Mikrowellenstrahlung auf die Rückfaltung von Peptidstängen an der festen Phase.

Für die Synthese polyfunktioneller Peptide ist eine Blockierung der funktionellen Gruppen erforderlich. Dabei wird zwischen der basenlabilen, temporären 9H-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe für die Blockade des N-Terminus<sup>[251-252]</sup> und den permanenten, säurelabilen Schutzgruppen für die Blockade der funktionellen Seitenketten unterschieden. So werden Threonin und Serin als *tert.*-Butylether, Aspartat als *tert.*-Butylester, Histidin mit der Trityl-Gruppe und Arginin mit der Pmc- (2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-)<sup>[253-254]</sup> oder Pbf- (2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-)<sup>[255]</sup> Gruppe geschützt (Abb. 4.5). Für eine kurze Zusammenfassung über die Entwicklung der Arylsulfonamide als Schutzgruppe in der Peptidchemie empfiehlt sich der 2009 von *Isidro et al.*<sup>[256]</sup> veröffentlichte Artikel.

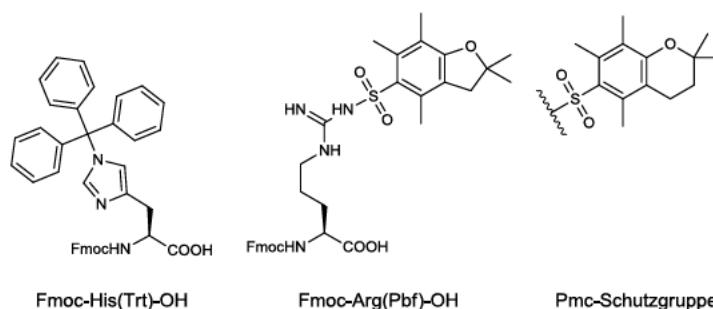
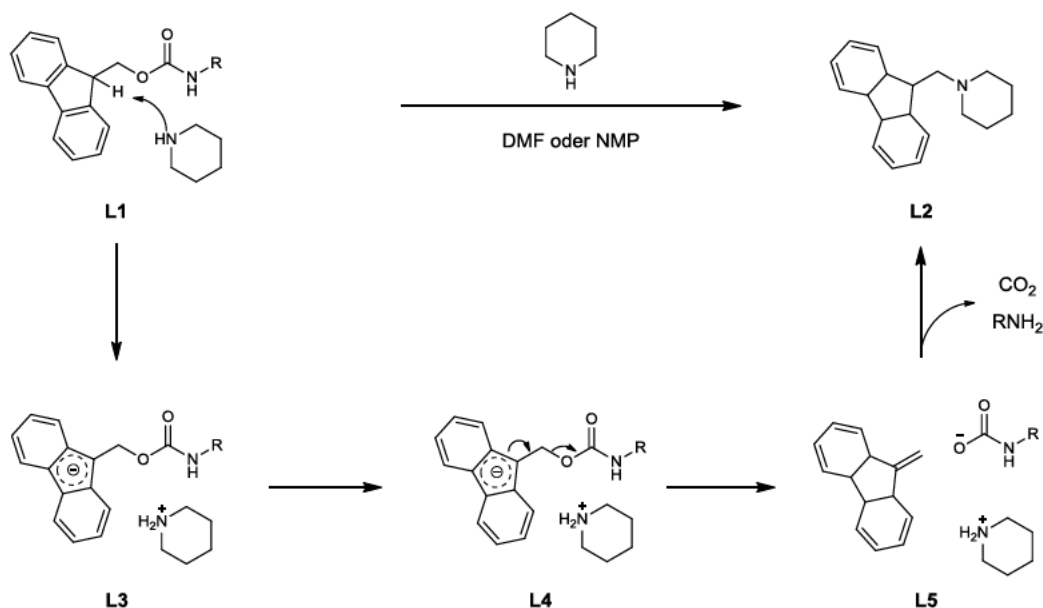


Abb. 4.5 Die Trityl-, Pbf- und Pmc-Schutzgruppe.

Die Kupplung der Aminosäurebausteine erfolgt in automatisierten, iterativen Zyklen. Dabei kann jeder Zyklus in drei Schritte unterteilt werden: Zunächst wird die terminale Aminofunktion durch Behandlung des Harzes mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in *N*-Methyl-piperidon oder *N,N*-Dimethylformamid deblockiert. Alternativ können bei der Synthese von Glycopeptiden auch Morpholin<sup>[251, 257-259]</sup> oder Piperazin<sup>[250, 260]</sup> verwendet werden. Letzteres spielt besonders in der Kombination mit HOBt bei der Deblockierung von Asparaginsäure in Synthesen mit Mikrowelleneinsatz eine große Rolle.<sup>[261]</sup> Zur Reaktionskontrolle kann die UV-Absorption des bei der Reaktion entstehenden Dibenzofulven-Piperidin-Addukts gemessen werden. Der Vergleich der gemessenen

Werte erlaubt Rückschlüsse über die Qualität der durchgeführten Kupplungen, jedoch keine Quantifizierung (Schema 4.41).



Schema 4.41 Mechanismus der Fmoc-Deblockierung mit Piperidin als Base.

Der erfolgreichen Deblockierung schließt sich die Kupplung des nächsten Aminosäurebausteins an. Je nach Gerät und Schwierigkeitsgrad der Kupplung kann dieser Schritt einige wenige Minuten in der *Liberty1* oder auch über acht Stunden für die Kupplung von Glycosylaminosäuren im *ABI 433A* in Anspruch nehmen. Im Standardprotokoll werden zwischen fünf und zehn Äquivalenten (bezogen auf das Harz) der zu kuppelnden Aminosäure eingesetzt. Als Kupplungsreagenzien etablierte sich eine Kombination aus HBTU<sup>[262-263]</sup>, HOBT<sup>[264]</sup> und *Hünigs*-Base für die Standardkupplungsschritte. Es finden aber auch andere Kupplungsreagenzien der Benzotriazolfamilie oder Reagenzien mit ähnlichen Strukturmerkmalen Verwendung (vgl Abb. 4.6).<sup>[265]</sup>

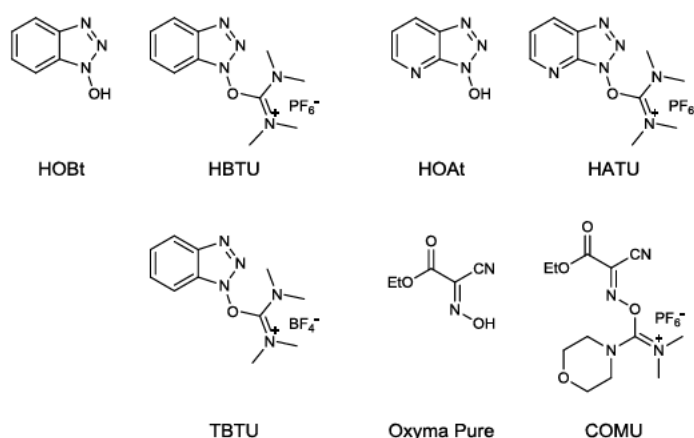
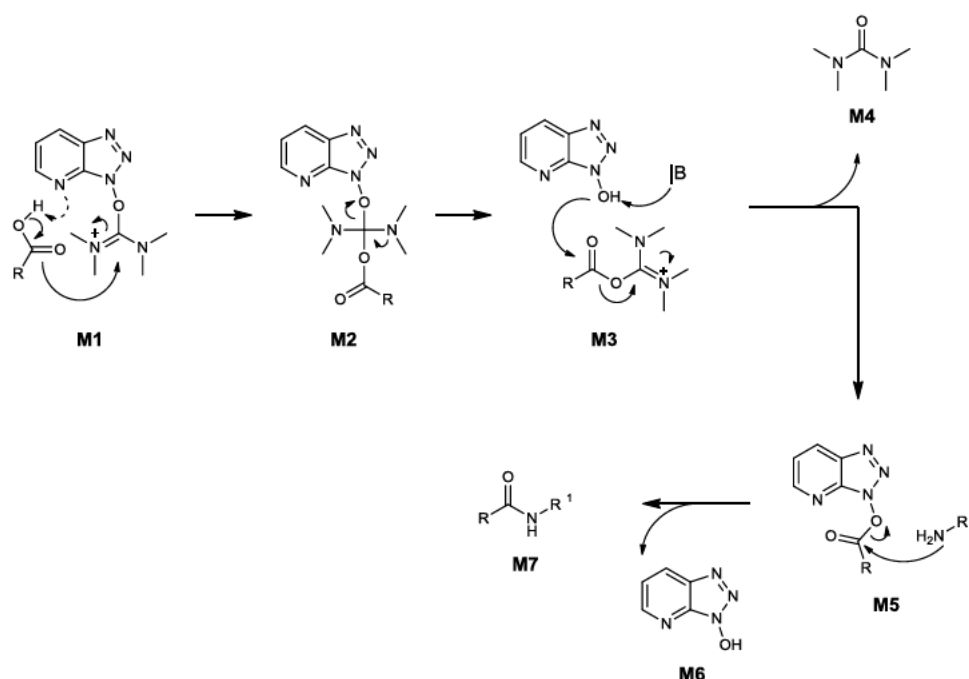


Abb. 4.6 Gängige Kupplungsreagenzien in der Peptidsynthese.

Für weniger reaktive Aminosäuren oder deren Derivaten bietet sich die Kombination HATU/HOAt<sup>[266-268]</sup> an, die aufgrund des Pyridinstickstoffs und der damit verbundenen Wasserstoffbrückenbindung zu einer erhöhten Reaktivität im Vergleich zu HBTU führt. *Zhang et al.* untersuchten in diesem Zusammenhang die Racemisierungstendenzen und die  $\beta$ -Eliminierung verschiedener Serin- und Threoninglycokongjugate in Abhängigkeit unterschiedlicher Kupplungsreagenzien.<sup>[269-270]</sup> Für das hier synthetisierte Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH konnten *Zhang et al.* allerdings sowohl die  $\beta$ -Eliminierung sowie die Racemisierung nur Spuren entsprechender Nebenprodukte feststellen. Der Mechanismus zur Knüpfung der Peptidbindung ist in Schema 4.42 an HATU stellvertretend für die gesamte Benzotriazolfamilie gezeigt.



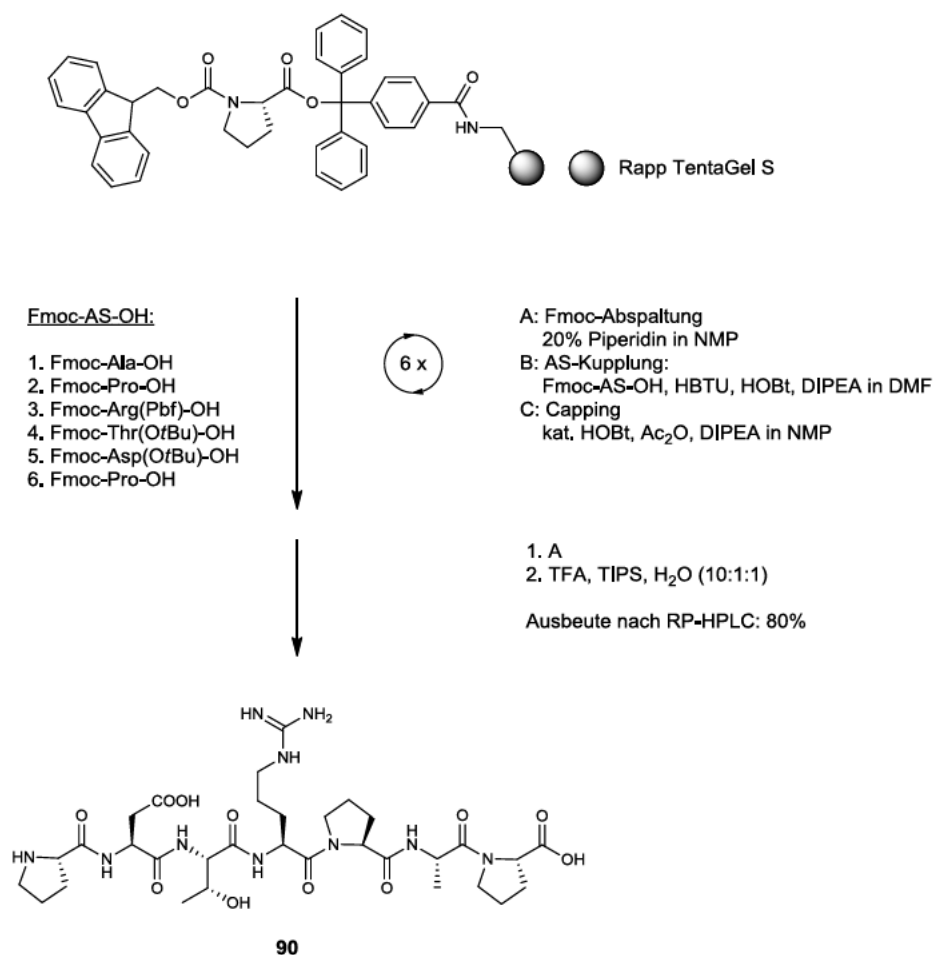
Schema 4.42 Mechanismus der HATU-Aktivierung.

Im Anschluss an jeden Kupplungsschritt können nicht umgesetzte Aminofunktionen mit einer Mischung aus Essigsäureanhydrid, *Hünigs*-Base und katalytischen Mengen HOBt acetyliert werden, um die Bildung komplexer und schwer zu trennender Produktgemische zu verhindern. Ist ein Kupplungsschritt erschwert, z.B. durch den sterischen Anspruch der letzten Aminosäure auf dem Harz oder durch eine schlechte Reaktivität der zu kuppelnden Aminosäure, so kann der Kupplungsschritt ohne zwischenzeitige Acetylierung wiederholt werden. Diese Doppelkupplung wird i.d.R. unter den gleichen Bedingungen wie eine einfache Kupplung durchgeführt. Die abschließende Spaltung der Peptide vom Trägerharz erfolgt im Fall der in dieser Arbeit synthetisierten MUC1-Teilsequenzen bzw. deren Derivate unter simultanem Verlust der permanenten Seitenkettenschutzgruppen in einer Mischung aus TFA, TIPS und Wasser. Häufig werden auch andere Kationenscavenger als TIPS<sup>[271]</sup>, wie z.B. EDT, DTE, *p*-Kresol<sup>[272]</sup> oder ähnliches, verwendet,<sup>[273]</sup> die im Falle des hier etablierten Systems jedoch keine Anwendung finden. Abschließend werden die

Rohpeptide in Diethylether<sup>[274]</sup> ausgefällt und schließlich durch präparative RP-HPLC gereinigt.

#### 4.7.2 Synthese der *PDTRPAP*-Sequenz

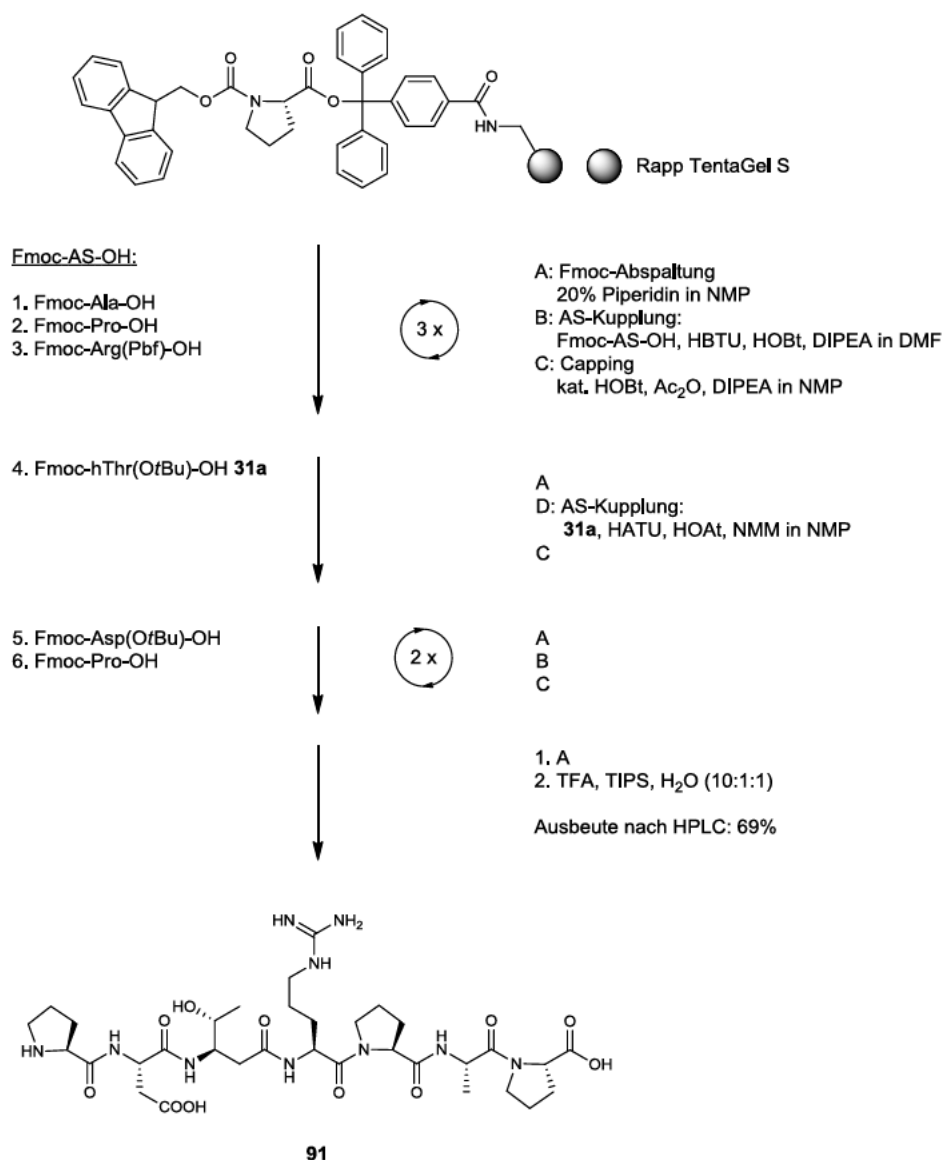
Als Referenz für spätere vergleichende Strukturuntersuchungen wurde die immun-dominante Domäne *PDTRPAP* des epithelialen Mucins MUC1 synthetisiert (vgl. Schema 4.43). Hierzu wurde ein mit der Startamino­säure Fmoc-Pro (Ansatzgröße 0.1 mmol) vorbeladenes Trityl-TentaGel S-Harz eingesetzt. Der Einsatz des säurelabilen Trityl-Ankers erlaubt die simultane Abspaltung des Peptids von der festen Phase sowie aller Seitenkettenschutzgruppen, wodurch zusätzliche Deblockierungsreaktionen vermieden werden. Darüber hinaus unterdrückt der Trityl-Linker durch seine sterisch anspruchsvolle Struktur die in Schema 4.40 gezeigte Diketopiperazinbildung. Die Synthese erfolgte nach dem beschriebenen Standardprotokoll für den *ABI 433A*. Im Anschluss an die Kupplung der letzten Aminosäure, Fmoc-Pro-OH, wurde das Harz in einen Merrifield-Glasreaktor überführt und in einer Mischung aus Trifluoressigsäure und den Kationenfängern Triisopropylsilan und Wasser geschüttelt. Das vom Harz gespaltene Peptid wurde lyophilisiert und anschließend durch präparative RP-HPLC gereinigt. Das Peptid **90** konnte dabei in einer Ausbeute von 80% erhalten werden (vgl. Schema 4.43).



Schema 4.43 Synthese der PDTRPAP-Sequenz am ABI 433A.

### 4.7.3 Synthese der PD(hT)RPAP-Sequenz

Um mögliche Strukturunterschiede durch den Einfluss von  $\beta$ -Aminosäuren zu untersuchen, wurde in die in Abschnitt 4.7.2 gezeigte Sequenz an der 3-Position variiert und es wurde  $\beta^3$ -homo-Threonin statt Threonin verwendet. Die Synthese verlief in weiten Teilen analog zu der oben beschriebenen Prozedur. Die  $\beta$ -Aminosäure wurde halbautomatisch gekuppelt. Nach der Deblockierung des an das Harz gekuppelten Arginins, wurden 2.0 Äquivalente der Aminosäure Fmoc-hThr(OtBu)-OH **31a** mit 2.1 Äquivalenten der Kupplungsreagenzien HATU und HOAt in NMP gelöst. Als Base dienten 5.0 Äquivalente *N*-Methylmorpholin (Äquivalente bezogen auf das Harz). Die Reaktionsmischung wurde manuell in den Reaktor überführt. Die reine Kupplungszeit betrug für das Fmoc-hThr(OtBu)-OH **31a** acht Stunden. Die weiteren Syntheseschritte, sowie die Abspaltung vom Harz und die Reinigung erfolgten nach den oben genannten Methoden, wodurch das Hybridpeptid **91** in 69% Ausbeute erhalten werden konnte (vgl. Schema 4.44).



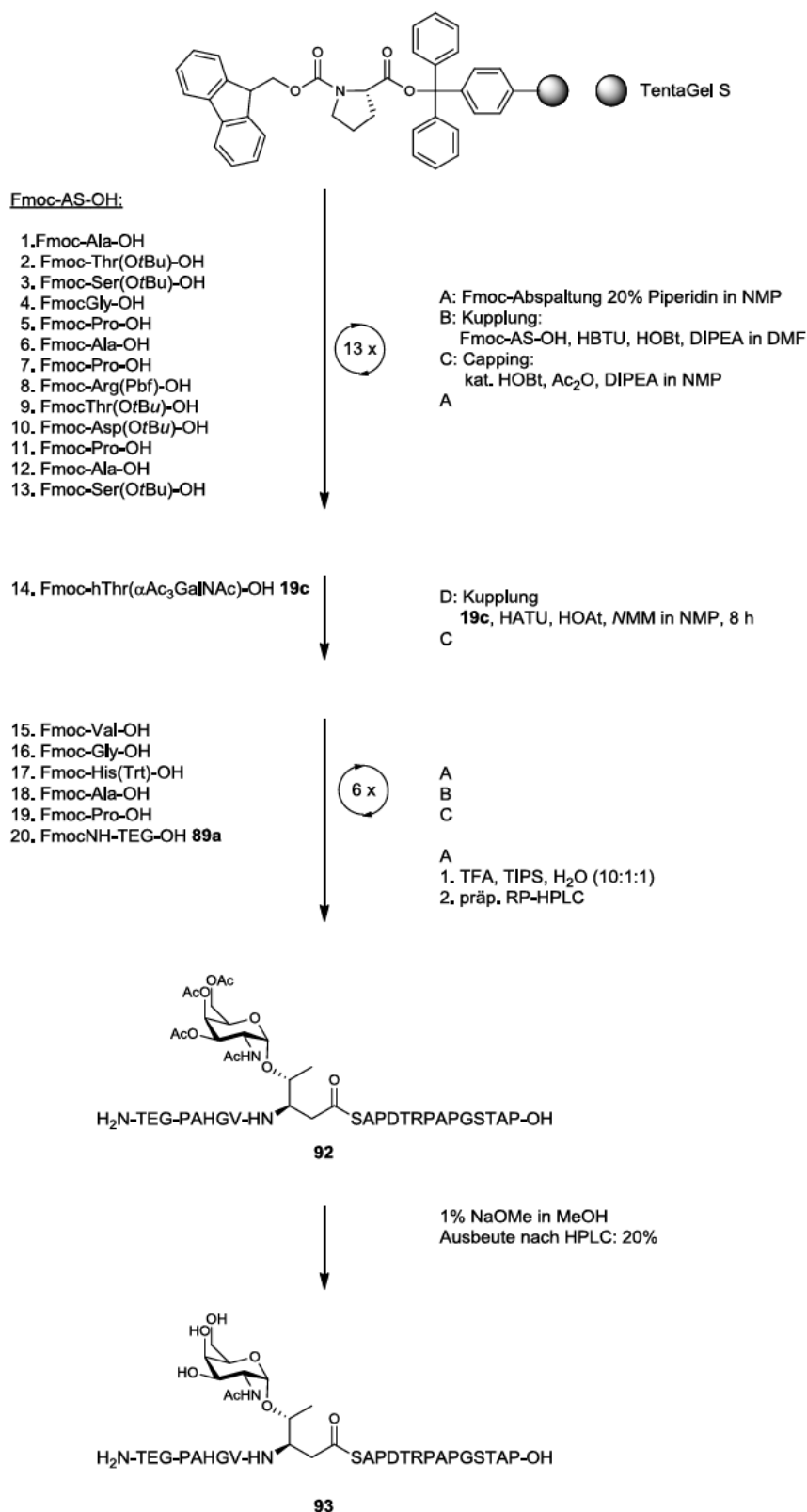
Schema 4.44 Synthese der PD(hT)RPAP-Sequenz am ABI 433A.

#### 4.7.4 Synthese der *tandem repeat unit* des MUC1 mit $\beta^3$ -homo-GalNAc-Threonin<sup>6</sup> und einem *N*-terminalen Triethylenglycolspacer

Die Synthese eines ersten  $\alpha/\beta$ -Hybridpeptids mit  $\beta^3$ -homo-Tn **19c** erfolgte in einem ABI 433A der Fa. Applied Biosystems. Die Darstellung erfolgte gemäß des Fastmoc 0.1 mmol Standardprogramms. Es wurden 1.5 Äquivalente des  $\beta^3$ -homo-Threoninbaustein **31a** eingesetzt. Als Kupplungsreagenzien wurde das im Vergleich zu HBTU/HOBt reaktivere HATU/HOAt-Paar mit je 1.65 Äquivalenten eingesetzt. Als Base dienten 5.0 Äquivalente NMM. Zusätzlich wurde die Kupplungszeit auf acht Stunden erhöht. Die Aminosäuren 1-5 sowie der Triethylenglycolspacer wurden gemäß des Standardprotokolls gekuppelt. Die Spaltung vom Harz erfolgte mit TFA, TIPS, H<sub>2</sub>O in einem Merrifield-Glasreaktor. Nach RP-HPLC-Reinigung erhielt man das Peptid **92**,



welches mit 1%-iger Natriummethanolatlösung in Methanol in einer modifizierten *Zemplén*-Veresterung deblockiert wurde. Erneute RP-HPLC-Reinigung ergab nach Lyophilisation 44 mg (0.02 mmol, 20%) eines farblosen amorphen Feststoffs **93**.



Schema 4.45 Synthese des Glycopeptids **93** mit Triethylenglycolspacer und  $\beta^3$ -homo-Tn-Antigenanalogon an Position 6.

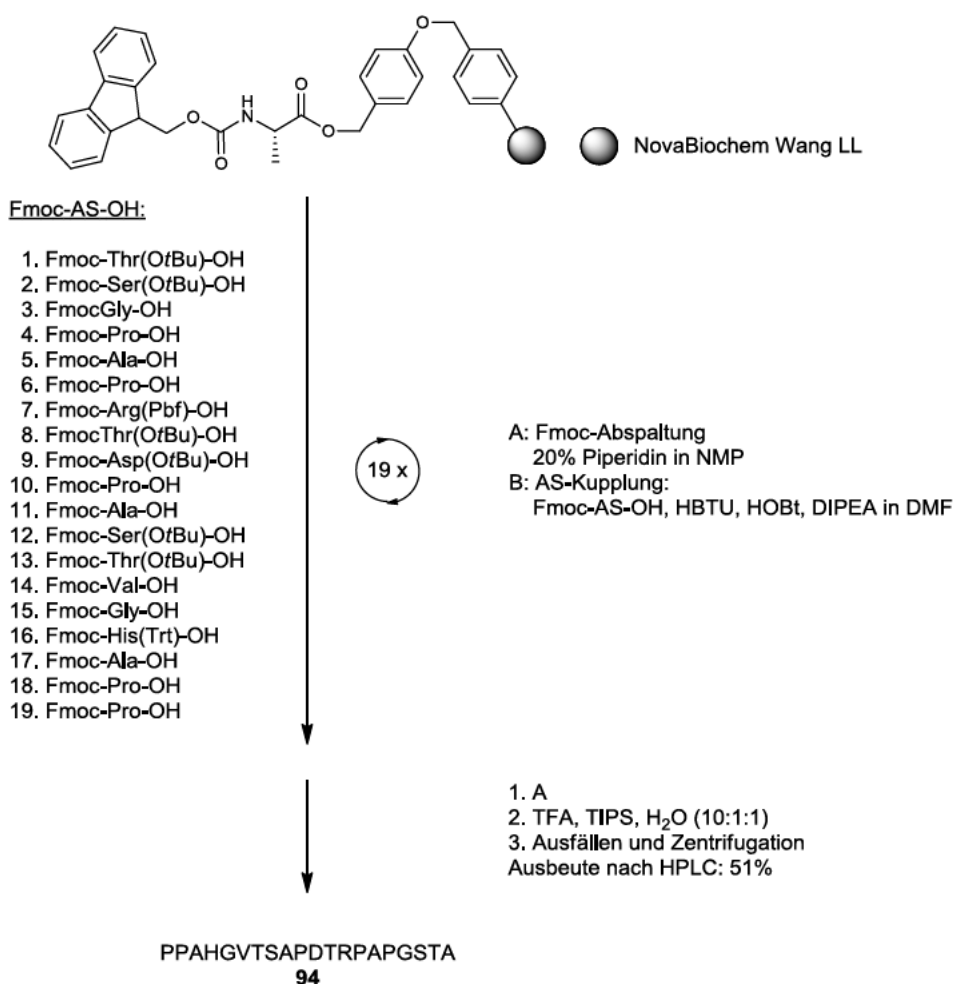
#### 4.7.5 Synthese der vollständigen *tandem repeat unit* des MUC1

Die Synthese der *tandem repeat unit* des Mucins MUC1 erfolgt in der *Liberty1* in Kombination mit der Mikrowelle *Discovery* (beide Fa. *CEM*). Hierzu wurde ein variiertes Protokoll der Fa. *CEM* mit den nachfolgenden Leistungs- und Temperaturparametern verwendet:

Verwendete Aminosäure	Dauer [min]	Leistung [W]	Temp. [°C]
<b>Fmoc-Ala-OH</b>	8	23	80
<b>Fmoc-Gly-OH</b>	8	23	80
<b>Fmoc-Pro-OH</b>	8	23	80
<b>Fmoc-Val-OH</b>	8	23	80
<b>Fmoc-Thr(OtBu)-OH</b>	8	23	80
<b>Fmoc-Asp(OtBu)-OH</b>	8	23	80
<b>Fmoc-Ser(OtBu)-OH</b>	8	23	80
<b>Fmoc-His(Trt)-OH</b>	6	23	55
<b>Fmoc-Arg(Pbf)-OH</b>	30	23	80
	5	23	80
<b>Deprotection</b>	3	30	80
<b>Final Deprotection</b>	3	26	80

Tab. 4 Kupplungsbedingungen für die Synthese der MUC1 20mer.

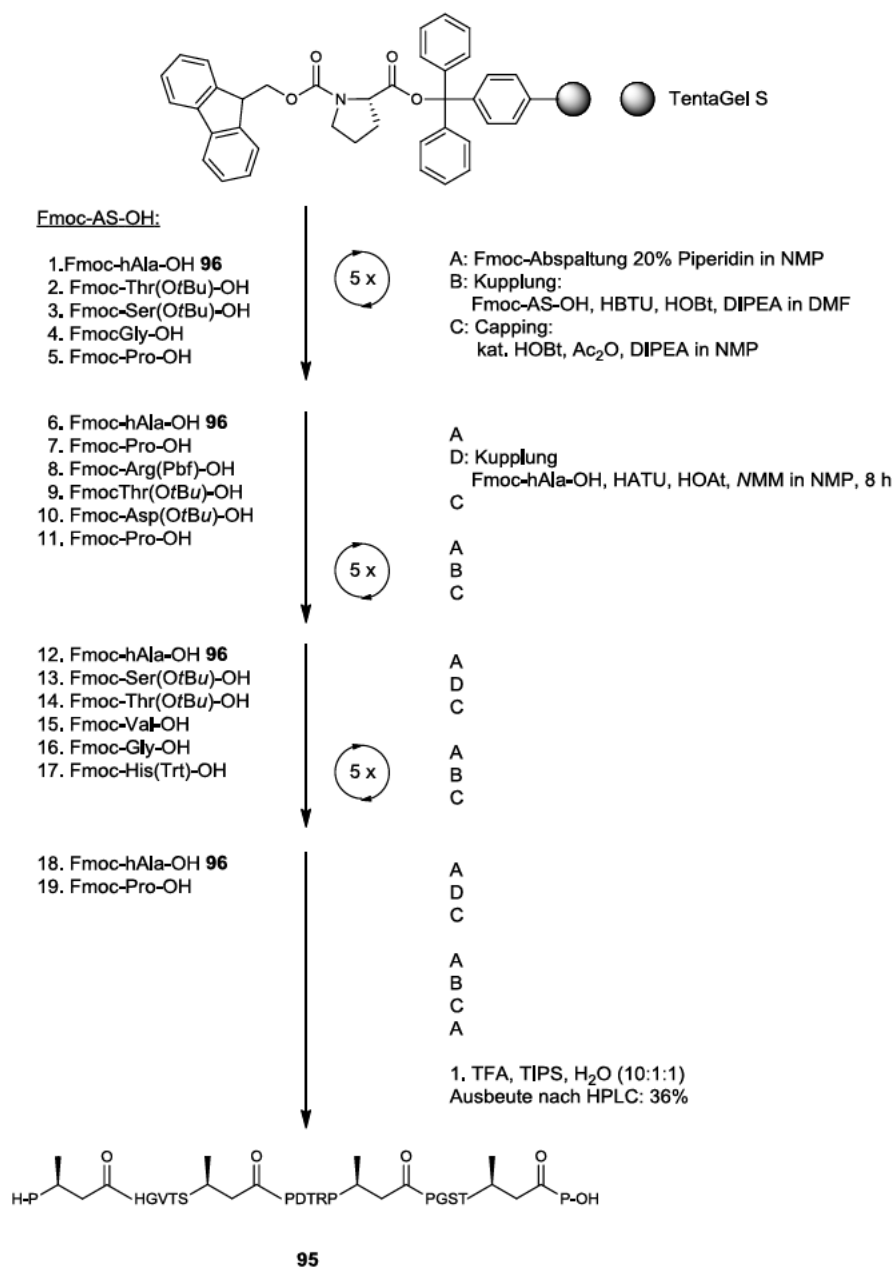
Die Abspaltung des fertigen Peptids **94** von der festen Phase erfolgte erneut mit einer Mischung von Trifluoressigsäure, Triisopropylsilan und Wasser im Verhältnis 10:1:1, wobei erste Versuche das Abspaltprotokoll an die Reaktionsbedingungen der Trityl-Harze anzupassen auf mäßigen Erfolg stieß. Erst die Spaltung zunächst in reiner Trifluoressigsäure für drei Stunden und die anschließende Zugabe der Kationenfänger Triisopropylsilan und Wasser führten zu vergleichbaren Ausbeuten. Das Rohpeptid wurde aus Diethylether ausgefällt und schließlich durch RP-HPLC gereinigt. Die Ausbeute betrug 51%.



Schema 4.46 Synthese des tandem repeat unit des humanen MUC1.

#### 4.7.6 Synthese der tandem repeat unit des MUC1 mit Substitution der Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>8</sup>, Ala<sup>12</sup> und Ala<sup>19</sup> gegen $\beta^3$ -homo-Alanin

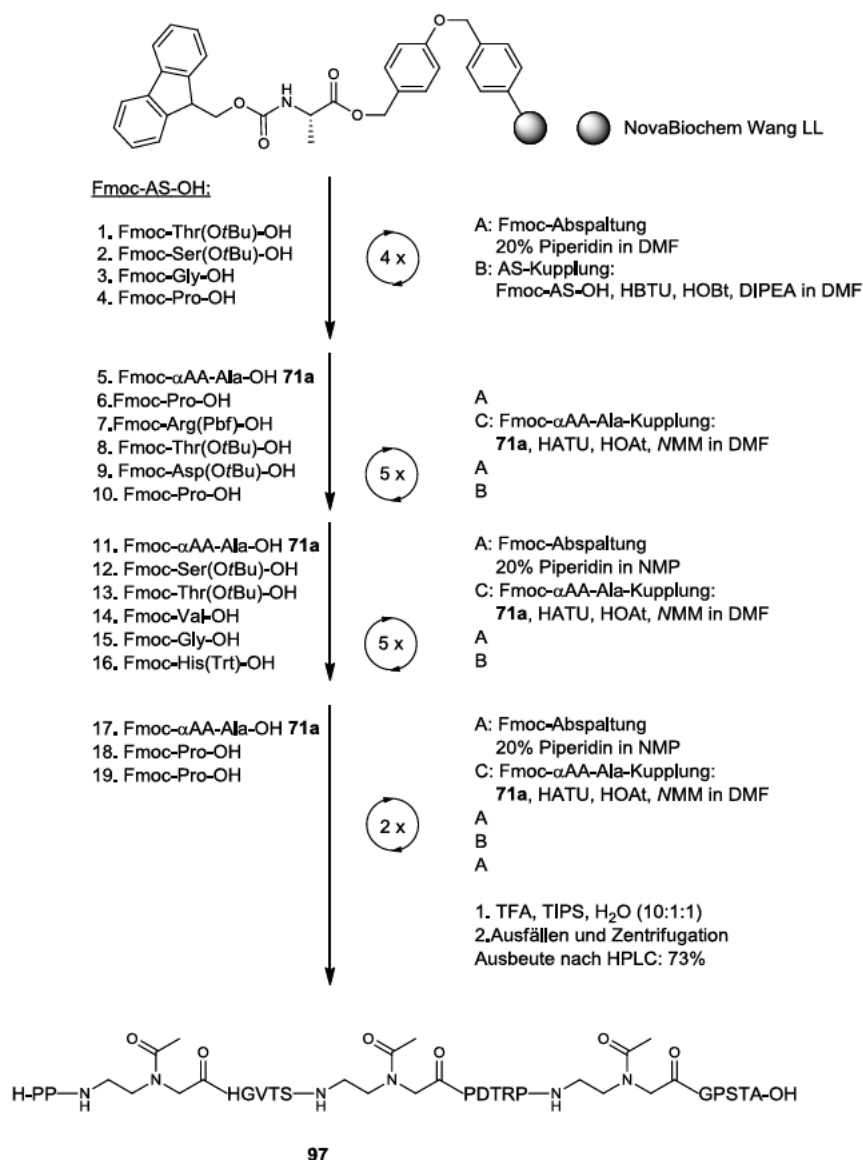
Eine Modellverbindung, um den Einfluss mehrerer  $\beta^3$ -Aminosäuren auf die metabolische Stabilität zu untersuchen, sollte das Hybridpeptid **95** darstellen, bei dem die Aminosäuren Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>8</sup>, Ala<sup>12</sup> und Ala<sup>19</sup> gegen  $\beta^3$ -homo-Alanin ersetzt wurden. Dies führte zu einem Hybridpeptid mit etwa gleichgroßen Subdomänen. Die Synthese erfolgte am *ABI 433A* mit auf 8 h verlängerten Kupplungszeiten für Fmoc-hAla-OH **96**, wodurch eine Ausbeute von 36% nach RP-HPLC-Reinigung erreicht werden konnte.



Schema 4.47 Synthese des MUC1-Hybridpeptids **95**.

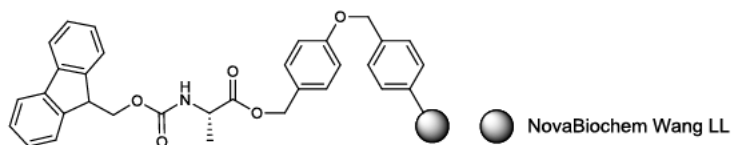
#### 4.7.7 Synthese der *tandem repeat unit* des MUC1 mit Substitution der Ala<sup>3</sup>, Ala<sup>9</sup> und Ala<sup>13</sup> gegen $\alpha$ AA-Alanin

Um den Einfluss der  $\alpha$ AA-Aminosäuren auf die metabolische Stabilität der *tandem repeat unit* zu untersuchen, wurde das Hybridpeptid **97** synthetisiert. Die Synthese erfolgte an der *Liberty1* mit verlängerten Kupplungszeiten für  $\alpha$ AA-Alanin **71a**. Hierbei wurde analog des  $\alpha/\beta$ -Hybridpeptids **95** die Aminosäure Alanin in den Positionen 3, 9 und 13 gegen  $\alpha$ AA-Alanin substituiert. Die Ausbeute für das Peptid **97** betrug nach RP-HPLC 73%.

Schema 4.48 Synthese des Peptidmimetikums mit Alanin-Analogon **71a**.

#### 4.7.8 Versuch der Synthese der *tandem repeat unit* des MUC1 mit $\alpha$ AA-Tn-Antigenanalogon auf Position 7

Um die Eignung der neuartigen Glycosylaminosäurederivate hinsichtlich der SPPS zu untersuchen, wurde analog des  $\alpha/\beta$ -Hybridpeptids **92** versucht, ein  $\alpha$ AA-Hybridpeptid zu synthetisieren. Dieses sollte ein  $\alpha$ AA-Tn-Derivat **75a** in Position 6 beinhalten. Aufgrund eines technischen Defekts bei der finalen UV-Messung, wurde gefolgert, dass der Einbau von Pro<sup>1</sup> nicht stattfand, worauf entschieden wurde, die Kupplung erneut durchzuführen. Letzteres führte zu einem Doppeleinbau des N-terminalen Prolins, so dass eine fehlerhafte, aber MUC1-ähnliche Sequenz *PPPAHGV( $\alpha$ AATn)SAPDTRPAPGSTA* entstand. Die Kupplungszeit für das Derivat  $\alpha$ AA-Tn wurde auf 2 h erhöht, wodurch für das Peptid **98** eine Ausbeute von 64% nach RP-HPLC erreicht werden konnte.

**Fmoc-AS-OH:**

1. Fmoc-Thr(OrBu)-OH
2. Fmoc-Ser(OrBu)-OH
3. Fmoc-Gly-OH
4. Fmoc-Pro-OH
5. Fmoc-Ala-OH
6. Fmoc-Pro-OH
7. Fmoc-Arg(Pbf)-OH
8. Fmoc-Thr(OrBu)-OH
9. Fmoc-Asp(OrBu)-OH
10. Fmoc-Pro-OH
11. Fmoc-Ala-OH
12. Fmoc-Ser(OrBu)-OH

12 x

- A: Fmoc-Abspaltung  
20% Piperidin in DMF
- B: AS-Kupplung:  
Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF

**13. Fmoc-αAA-Tn-OH 75a**

14. Fmoc-Val-OH
15. Fmoc-Gly-OH
16. Fmoc-His(Trt)-OH
17. Fmoc-Ala-OH
18. Fmoc-Pro-OH
19. Fmoc-Pro-OH
20. Fmoc-Pro-OH

8 x

- A
- C: Fmoc-αAA-Tn-Kupplung:  
**75a**, HATU, HOAt, NMM in DMF

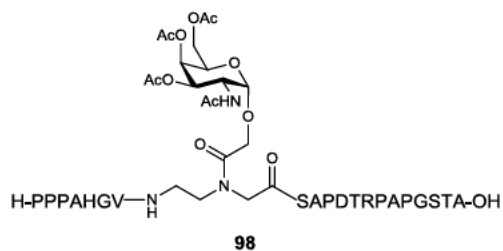
A

B

A

1. TFA, TIPS, H<sub>2</sub>O (10:1:1)
2. Ausfällen und Zentrifugation

Ausbeute nach HPLC: 64%



Schema 4.49 Synthese des Glypeptidmimetikums **98** mit Tn-Antigenanalogon **75a**.



## 4.8 Stabilitätstests und Strukturuntersuchungen

### 4.8.1 NMR-spektroskopische Untersuchungen der immundominanten Domäne PDTRPAP

Eine der Fragestellungen dieser Arbeit beschäftigte sich mit den strukturellen Ähnlichkeiten oder den Unterschieden von  $\beta$ -Aminosäuren in der *tandem repeat unit* des Mucis MUC1. Um den Einfluss in einem übersichtlichen Molekülabschnitt zu untersuchen, wurde die immundominante Domäne PDTRPAP als  $\alpha$ -Peptid und als  $\alpha/\beta$ -Hybridpeptid synthetisiert, wie es in den Abschnitten 4.7.2 und 4.7.3 beschrieben wurde. Die Heptapeptide **90** und **91** wurden NMR-spektroskopisch untersucht, um aus den NOESY-Spektren räumliche Strukturen abzuleiten. Die nachfolgende Abb. 4.7 zeigt die aus den NOESY-Spektren ermittelten Konnektivitäten. Vergleicht man diese, so ist vor allem auffällig, dass nun auch Kopplungen zwischen den *N*-terminalen Aminosäuren Prolin und Asparaginsäure sowie den *C*-terminalen Aminosäuren Prolin und Alanin ausgebildet werden. Dies lässt sich verstehen, wenn man annimmt, dass die zusätzliche Methylengruppe, die Freiheitsgrade im Peptidrückgrat erhöht. Es besteht die Möglichkeit, dass der Einbau des  $\beta$ -Threonins in der immundominanten Domäne zu einer verstärkten Ausbildung des *turn*-Motivs führt. Dieser Effekt kann bei längeren und glycosylierten Peptiden aufgrund des stärker werdenden Einflusses des Kohlenhydratrests verloren gehen.

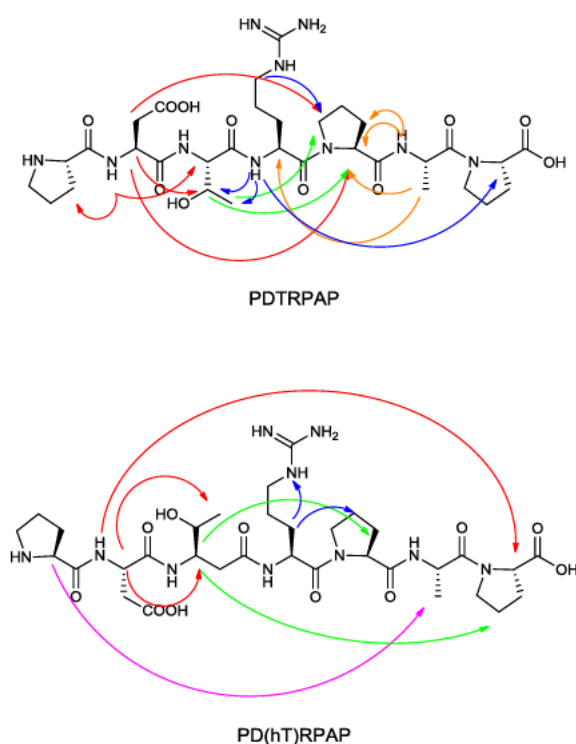


Abb. 4.7 Aus den NOESY-Spektren ermittelte Konnektivitäten

## 4.8.2 Enzymatischer Abbau der Modellpeptide 94, 95 und 97

Um den Nutzen und die Anwendungsmöglichkeiten von MUC1-Mimetika mit  $\beta^3$ -Aminosäuren oder  $\alpha$ AAP-Bausteinen zu untersuchen, wurden einige der in Abschnitt 4.7 beschriebenen Modellpeptide einem enzymatischen Abbau unterworfen.

### 4.8.2.1 Abbauversuche des Glycopeptids 93 in humanem Blutserum<sup>e</sup>

In einem ersten Versuch sollte Peptid **93** in humanem Serum verdaut werden, um eine qualitative Aussage über die Wirkung  $\beta^3$ -homo-Tn-Threoninkonjugats an Position 6 treffen zu können. Der Versuch blieb allerdings ohne Erfolg. Weder die natürliche Struktur noch das modifizierte Peptid zeigten einen Verdau per LC-MS.

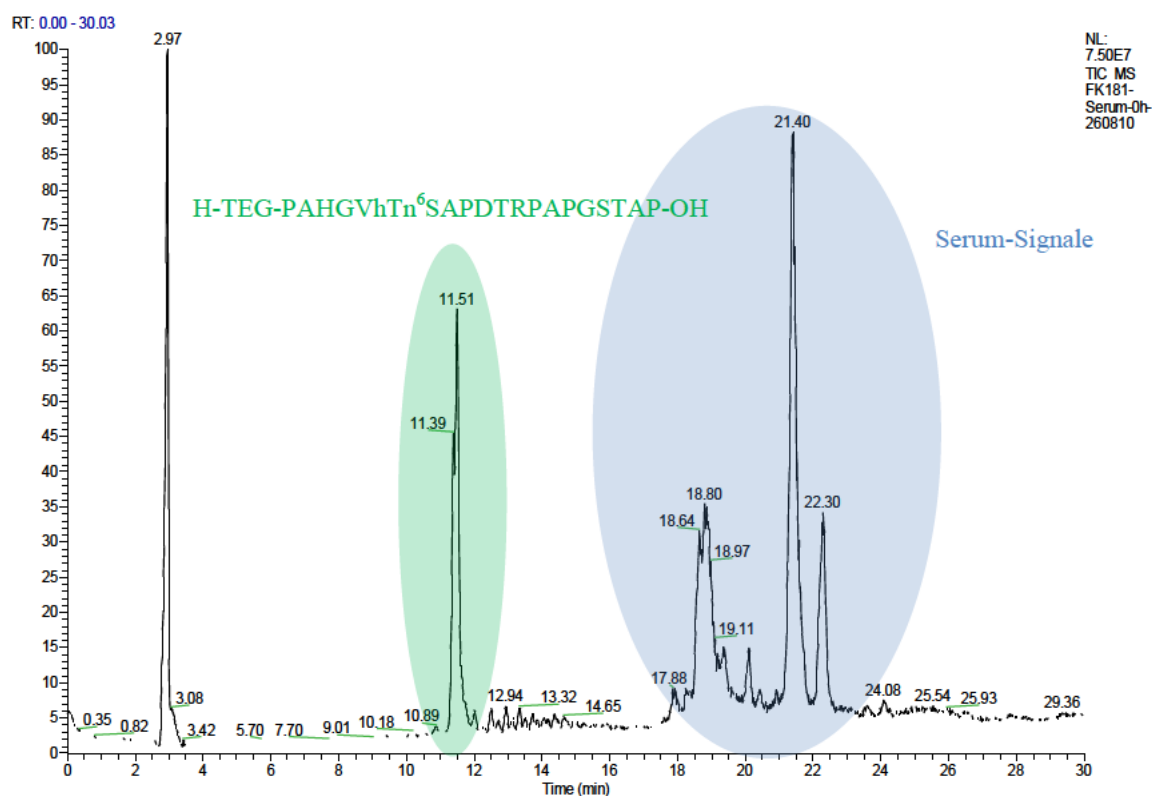


Abb. 4.8: Das modifizierte Peptid **93** mit  $\beta^3$ -homo-Tn<sup>6</sup> als Referenz zum Zeitpunkt  $t = 0$ .

Eine deutlich längere Inkubationszeit konnte den enzymatischen Abbau nicht positiv beeinflussen (vgl. Abb. 4.8 und Abb. 4.9). An dieser Stelle lässt sich vermuten, dass die hohe Stabilität durch den TEG-Linker hervorgerufen wird. Polyethylenglycol-Linker sind in der Literatur<sup>[122, 275]</sup> als Methode bekannt, die Stabilität und Halbwertszeit biologisch aktiver Peptide zu erhöhen. Allerdings werden in diesem Zusammenhang häufig deutlich

<sup>e</sup> Für die Durchführung der Abbauversuche in humanem Blutserum möchte ich Dr. Felix Nissen (zum damaligen Zeitpunkt Postdoc an der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg) danken.

höhere polymere Einheiten wie z.B. PEG<sub>400</sub> eingesetzt. Möglicherweise spielt in diesem Zusammenhang gar nicht die absolute Länge des PEG-Linkers, sondern vielmehr der prozentuale Anteil im Vergleich zur Peptidlänge eine Rolle. Bisher wurden noch keine Studien zum Einfluss eines Polyethylenglycol-Linkers auf die metabolische Stabilität eines MUC1-Vakzin-Konjugats beschrieben. Als Referenz für die hier genannte Verbindung diene das von *Anton Kaiser* synthetisierte H-TEG-MUC1(Tn)<sup>6</sup>-OH.

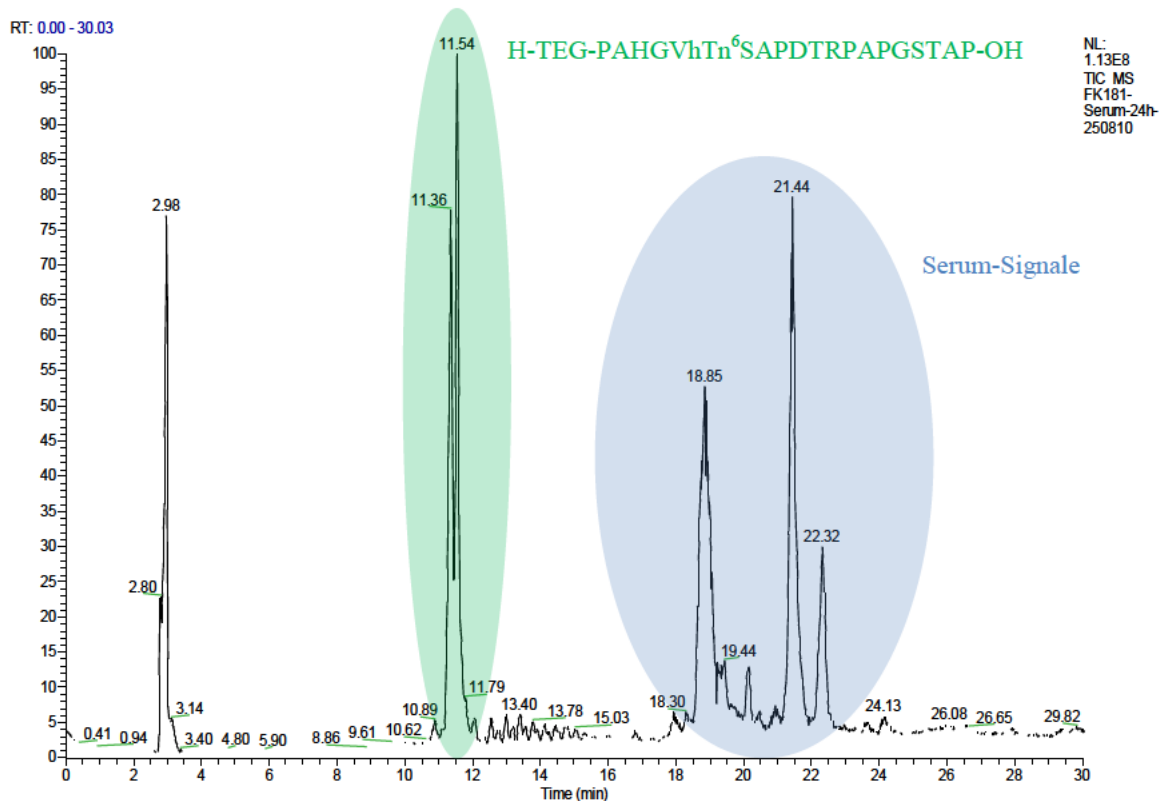


Abb. 4.9: Das modifizierte Peptid **93** mit  $\beta^3$ -homo-Tn<sup>6</sup> nach  $t = 24$  h.

#### 4.8.2.2 Verdauungsversuche mit dem Modellsystem Proteinase K

Ein schlechter Zugang zu humanem Serum und der damit verbundene Aufwand sowie ein möglicher Verschleiß von HPLC-Säulen durch Serumbestandteile ließen für diese Arbeit die Frage nach einem Modellsystem aufkommen, insbesondere, um Verbindungen ohne Triethylenglycol-Spacer zu untersuchen. Das Modellsystem sollte zwei Kriterien erfüllen:

1. Das Enzym muss leicht von der Probe zu trennen sein, um die Übersichtlichkeit der Probe zu wahren und ein Verstopfen der HPLC-Säulen zu vermeiden.
2. Es müssen genügend Schnittstellen im 20mer vorhanden sein, wobei eine hohe Anzahl an potenziellen Schnittstellen dabei die Wahrscheinlichkeit eines enzymatischen Abbaus erhöht.

Benutzt man das im Internet frei verfügbare Programm *PeptideCutter*,<sup>[276]</sup> wird unter anderem für die *tandem repeat unit* des Mucins MUC1 das unspezifische Enzym Proteinase K vorgeschlagen. Letzteres ist kommerziell auf fester Phase (Eupergit® C, Sigma Aldrich, Art.-Nr. 82452) erhältlich, was eine Reinigung der analytischen Proben durch Abfiltrieren oder Dekantieren ermöglicht. Die Reaktionen wurden in Anlehnung an *Hook et al.*<sup>[127]</sup> durchgeführt. Dabei wurde als Inkubationsmedium ein 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH = 7.8) mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> verwendet. Die Inkubation erfolgte dabei für definierte Zeitabschnitte, während die Inkubationstemperatur 37 °C betrug. Der Abbruch der Inkubationszeiten erfolgte durch Zugabe von 100 µL 20%iger Essigsäure. Alle Proben wurden mittels HPLC vermessen und der Restgehalt an Peptid in Lösung wurde bestimmt. Als Nachweis, dass sich der Gehalt an Peptid proportional zu Peakfläche verhält, wurden für die drei Peptide **94**, **95** und **97** Kalibrationsgeraden aufgenommen, die sicherstellen sollten, dass die Absorption in linearem Zusammenhang zur Peptidmenge in Lösung steht. In Abb. 4.10 sind die Kalibrationsgeraden dargestellt, die im Wesentlichen auch einen linearen Zusammenhang widerspiegeln.

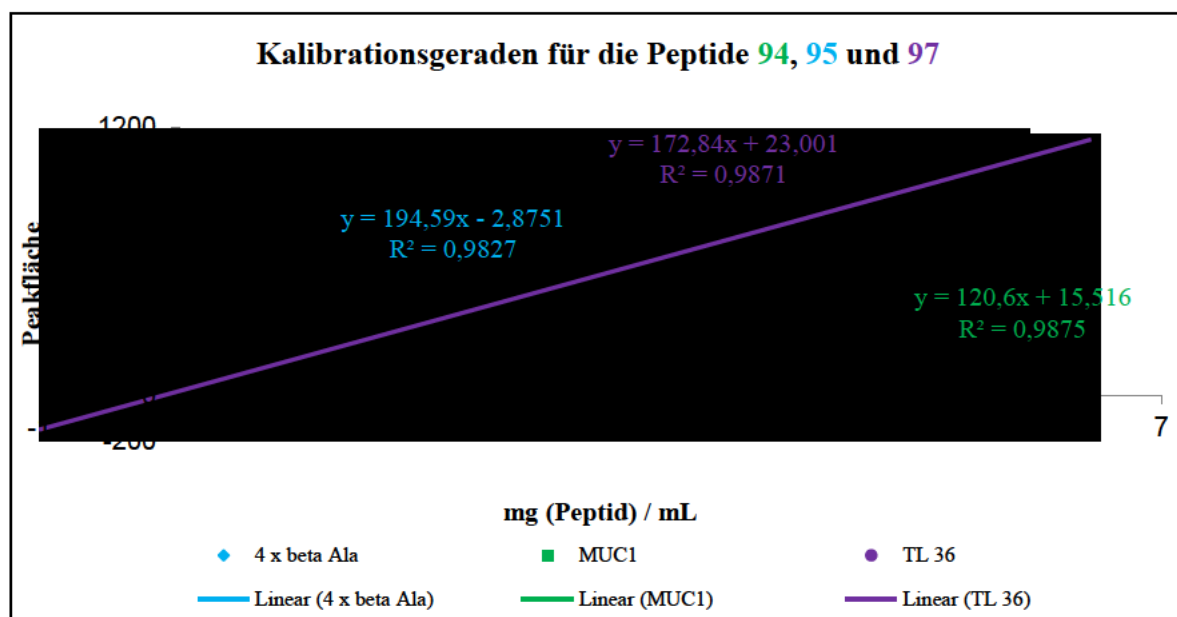


Abb. 4.10 Die Kalibrationsgerade für die Peptide **94**, **95** und **97**.

Nachfolgend sind die ermittelten Werte an Restpeptid für die natürliche Struktur des MUC1 **94**, eines  $\alpha/\beta$ -Hybridpeptids **95** und eines *N*-Aminoethyl-*N*-Acyl-glycin-Hybridpeptids **97** vergleichend dargestellt. Keines der hier gezeigten Peptide trägt N-terminal einen Triethylenglycol-Spacer. Während die natürliche MUC1-Sequenz **94** innerhalb von zehn Minuten vollständig abgebaut wird, zeigen sowohl das  $\alpha/\beta$ -Hybridpeptid **95** als auch das Hybridpeptid **97** vergleichbare Stabilitäten innerhalb der ersten zehn Minuten. Die Ergebnisse können nicht absolut gesehen werden, geben aber einen qualitativen Eindruck über eine potenzielle Steigerung der enzymatischen Stabilität.

Letztlich zeigen die modifizierten MUC1-Sequenzen eine um ca. Faktor 2-5 höhere Stabilität gegenüber Proteinase K im Vergleich zum natürlichen 20mer (vgl. Abb. 4.11).

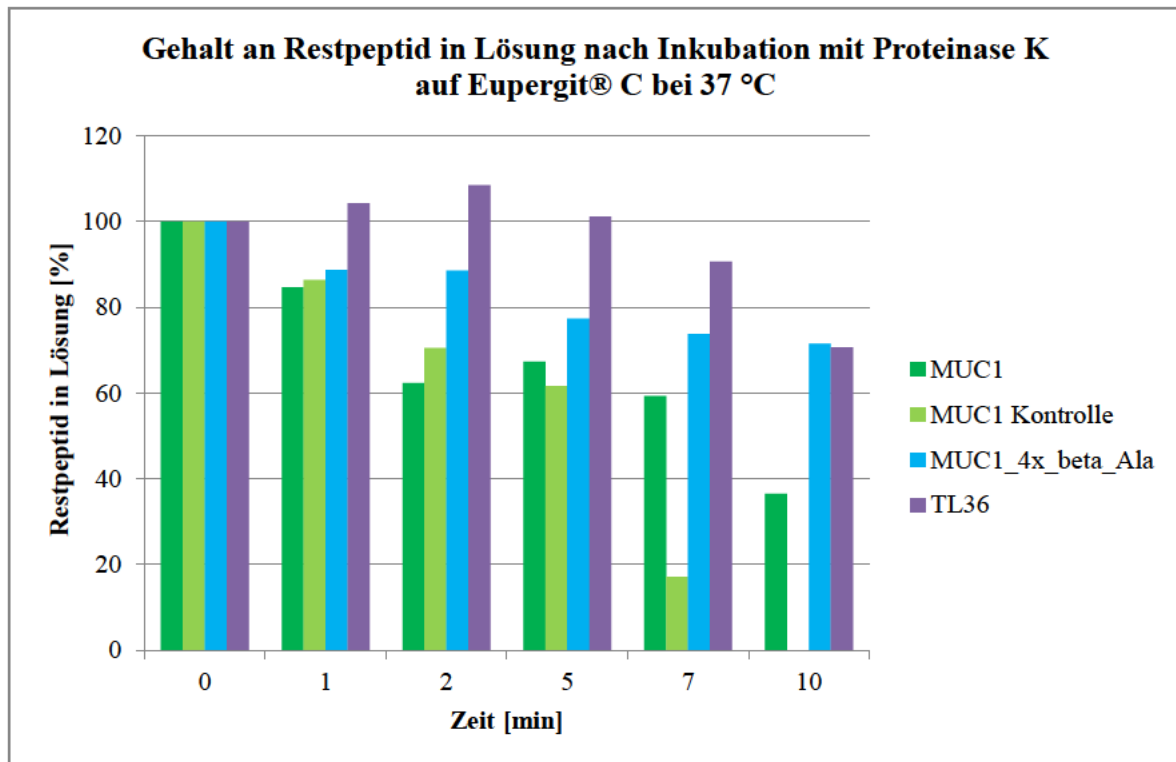
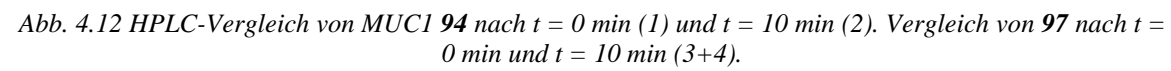


Abb. 4.11: Grafische Darstellung des Restgehalts an Peptid in Lösung nach Inkubation mit Proteinase K auf Eupergit® C und 37 °C.

In Abb. 4.12 sind vergleichend die HPLC-Spuren von MUC1 **94** (grün) und dem AA-Peptidanalogen **97** (violett) dargestellt. In den Teilen 1 und 2 ist zu erkennen, dass das Peptid **94** innerhalb der ersten 10 min verdaut wird und nur ein geringer Restanteil zurückbleibt. Gleichzeitig werden zwei neue Peaks in 2 gebildet (rot und blau), die in 1 noch nicht vorhanden sind. Peptid **97** zeigt im gleichen Zeitraum keine Peakneubildung.





## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Geräte und Materialien

#### 5.1.1 Kernresonanzspektroskopie

Die Kernresonanzspektren wurden bei Raumtemperatur an den Spektrometern AMX 600, WH 400, AC 300 und ARX 200 der Firma *Varian*, Palo Alto, aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen der Signale wurden in Einheiten der  $\delta$ -Skala (ppm) angegeben und beziehen sich bei den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren auf  $\delta$  (TMS) = 0. Zur Kalibrierung der  $^1\text{H}$ -Spektren wurden die Resonanzsignale der Restprotonen des deuterierten Lösungsmittels als internen Standard [ $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 7.26] genutzt. Die Kalibrierung der  $^{13}\text{C}$ -Spektren erfolgte über das  $^{13}\text{C}$ -Signal des Lösungsmittels [ $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 77.16]. Signalmultiplizitäten sind folgendermaßen abgekürzt: breites Singulett = bs, Singulett = s, pseudo Singulett = ps, Dublett = d, pseudo Dublett = pd, Dublett von Dubletts = dd, Triplett = t, pseudo Triplett = pt, Quartett = q, Multiplett = m. Die Angabe der Kopplungskonstante  $J$  erfolgt in Hertz (Hz). Die Strukturen wurden sinngemäß mit einer Abkürzung oder in den Peptiden mit dem Einbuchstabencode bezeichnet (siehe Tab. 5). Die Nummerierung startet sowohl für Carbon- als auch für Aminosäuren für Kohlenstoffe und Protonen gleichermaßen mit 1 für die Carboxylgruppe. Bei Unterbrechungen einer Kohlenstoffkette durch Heteroatome, wie z.B. in den  $\alpha\text{AAP}$ -Strukturen, werden diese ausgelassen und nur die Kohlenstoffe bzw. Protonen nummeriert.

Grundbaustein	Abkürzung
Galactose	Gal
<i>N</i> -Acetyl-galactosamin	GalNAc
<i>N</i> -Acetyl-neuraminsäure	Sia
Threonin	Thr
$\beta^3$ -homo-Threonin, $\beta^3$ -homo-Serin	hThr, hSer
Hydroxyessigsäure	hAc
Bernsteinsäure	BS
$\gamma$ -Hydroxybuttersäure	$\gamma\text{HBA}$
Peptidmodifikationen auf $\alpha\text{AAP}$ -Basis	C1, C2..., H1, H2...
<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl	Fmoc
2 <i>H</i> -Pyran	Py
Diacetongalactose	isoGal
3,4,6-Tri- <i>O</i> -Benzylgalctal	bnGal

Tab. 5 Verwendete Abkürzungen in der NMR-Spektroskopie

### 5.1.2 Massenspektrometrie

Zur Messung von Elektronenspray-Massenspektren (ESI) fand ein Thermo LTQFT Gerät der Fa. *Finnigen*, San Jose, Verwendung. Exakte Massen werden als [Masse] angegeben.

### 5.1.3 Schmelzpunkte

Alle Schmelzpunkte wurden an einer Schmelzpunktapparatur Melting Point B-540 der Fa. *Büchi*, Flawil, gemessen.

### 5.1.4 RP-HPLC-Systeme

RP-HPLC-Analysen wurden an einer Anlage der Fa. *JASCO*, Groß-Umstadt, durchgeführt, die aus einer PU-2080 Plus-Pumpe, einer tenären Gradienteneinheit LG-2080-02, einem 3-Wege-Entgaser DG-2080-53 und einem Diodenarraydetektor MD-2010 Plus besteht. Als RP-Säule wurde eine *C18-Luna* (5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4.6 mm) der Fa. *Phenomenex*, Torrance USA, benutzt. Es wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min gearbeitet.

Präparative RP-HPLC-Trennungen wurden ebenfalls an Anlagen der Fa. *JASCO*, Groß-Umstadt, bestehend aus zwei Gradientenpumpen PU-2087Plus, einem UV-Detektor (UV-2075Plus), sowie einer *Phenomenex Luna* (300, C18, 10  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  20 mm) durchgeführt. Es wurde mit einer Flussrate von 20 mL/min gearbeitet. Als Eluenten dienten für beide Systeme Gemische aus Wasser (A) und Acetonitril (B). Die Detektion der Produkte erfolgte, wenn nicht anders angegeben bei 212 nm. Acetonitril (HPLC-grade) wurde bei der Fa. *Fisher-Scientific*, Schwerte, erworben, das HPLC-Wasser wurde einer Arium<sup>®</sup> ProUV Reinstwasseranlage der Fa. *Sartorius Stedim Biotech*, Göttingen, entnommen.

### 5.1.5 Drehwerte

Die spezifischen Drehwerte wurden mit einem Polarimeter *P800-P8100-T* der Fa. *Krüss*, Hamburg, bestimmt und auf die Natrium-D-Linie (589.5 nm) extrapoliert. Lösungsmittel, Temperatur und Konzentration, die in g/100 mL angegeben ist, sind für die einzelnen Verbindungen vermerkt.

### 5.1.6 Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Aluminiumplatten-60-F254 der Firma *Merck*, Darmstadt, verwendet. Die Detektion erfolgte je nach Anforderung durch Fluoreszenzlöschung bei  $\lambda = 254$  nm, durch Anregung der Eigenfluoreszenz bei 366 nm und/oder durch Anfärbung mit Hilfe folgender Reagenzien beim Erhitzen:

- Ninhydrin-Reagenz (1.5 g Ninhydrin, 15 mL Eisessig und 500 mL Methanol).
- Seebach-Reagenz (2.5 g Molybdätophosphorsäure, 1.0 g Cer-(IV)-sulfat-tetrahydrat, 6 mL konzentrierte Schwefelsäure und 94 mL Wasser).
- Methoxyphenol-Reagenz (1:1-Mischung aus 0.2%iger ethanolischer *m*-Methoxyphenol-Lösung und 2 N ethanolischer Schwefelsäure).
- Iod.

Die verwendeten Fließmittelgemische werden in den entsprechenden Kapiteln unter Angabe der jeweiligen Volumenanteile vermerkt

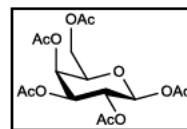
Als Säulenfüllmaterial für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel (Korngröße 35 bis 70  $\mu\text{m}$ ) der Firma *Acros Organics*, Geel, verwendet. Es wurde unter leichtem Überdruck gearbeitet.

## 5.2 Synthesen zu 4.1 – Galactosebausteine

### 5.2.1 $\beta$ -1,2,3,4,6-Penta-*O*-Acetyl-D-galactopyranose (**2**)<sup>[173]</sup>

$\beta$ Ac<sub>5</sub>Gal

Eine Suspension von 50.0 g (0.610 mol, 1.1 Äq.) wasserfreiem Natriumacetat in 600 mL Essigsäureanhydrid wurde auf 90 °C erhitzt. Die Heizquelle wurde entfernt und es wurden 100 g (0.555 mol, 1.0 Äq.) D-Galactose (**1**) in kleinen Portionen eingetragen. Die Reaktion wurde bis zum vollständigen Umsatz auf 90 °C erhitzt. Die Lösung wurde abgekühlt, auf 2 L Eiswasser gegeben und über Nacht gerührt. Die ausgefallene peracetylierte Galactose **2** wurde abgesaugt und mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen. Ausbeute: 148 g (379 mmol, 68%), eines farblosen Feststoffs.



$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ,  $M = 390.34 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [390.1162].

$R_f(\text{cHex:EtOAc} = 1:1) = 0.36$ .

Smb.<sup>[277]</sup>: 139-140 °C.

$[\alpha]_D^{20}$  ( $c = 1.00$ ,  $\text{CHCl}_3$ )<sup>[277]</sup> = + 22.

ESI-MS ( $m/z$ , positiv)<sup>[277]</sup>:  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\text{Na}^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 413.1054, gef. 413.1051.

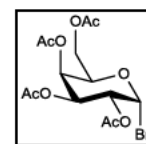
$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )<sup>[277]</sup>  $\delta = 5.68$  (d, 1H,  $^3J_{\text{Gal-H1/Gal-H2}} = 8.2$  Hz, Gal-H1), 5.40 (m, 1H, Gal-H4), 5.31 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Gal-H2/Gal-H1}} = 8.3$  Hz,  $^3J_{\text{Gal-H2/Gal-H3}} = 10.4$  Hz, Gal-H2), 5.06 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Gal-H3/Gal-H4}} = 3.6$  Hz,  $^3J_{\text{Gal-H3/Gal-H2}} = 10.3$  Hz, Gal-H3), 4.17 – 4.00 (m, 3H, Gal-H5, Gal-H6a,b), 2.14 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 2.10 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 2.04 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[277]</sup>

### 5.2.2 2,3,4,6-Tetra-*O*-Acetyl-1-desoxy- $\alpha$ -D-galactosylbromid (**3**)<sup>[174-175]</sup>

$\alpha$ Ac<sub>4</sub>GalBr

Eine Lösung von 25 mL Essigsäureanhydrid und 120 mL HBr in Eisessig (33%ig) wurde auf 0 °C gekühlt und mit 50.0 g (128 mmol) peracetylierter D-Galactose **2** versetzt. Nachdem sich die Galactose gelöst hatte, wurde die Kühlung wurde entfernt und die Lösung wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit 500 mL Dichlormethan verdünnt und auf Eiswasser gegeben. Die organische Phase wurde dreimal mit je 200 mL Wasser extrahiert und abschließend zweimal mit je 150 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutral gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Das Bromid **3** wurde roh weiter eingesetzt. Ausbeute: 160 g (128 mmol, quant.) eines gelben Öls.



C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub>Br, M = 411.20  $\frac{g}{mol}$ , [410.0212].

R<sub>f</sub>(cHex:EtOAc = 1:1) = 0.50.

Smb.<sup>[278]</sup>: 84.1 – 84.9 °C.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>)<sup>[278]</sup> = + 203.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>[279]</sup>  $\delta$  = 6.69 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H1/Gal-H2</sub> = 3.9 Hz, Gal-H1), 5.51 (m, 1H, Gal-H4), 5.39 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H3/Gal-H4</sub> = 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H3/Gal-H2</sub> = 10.6 Hz, Gal-H3), 5.04 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H2/Gal-H1</sub> = 4.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H2/Gal-H3</sub> = 10.6 Hz, Gal-H2), 4.47 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H5/Gal-H6ab</sub> = 6.8 Hz, Gal-H5), 4.23 – 4.04 (m, 2H, Gal-H6a,b), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac) ppm.

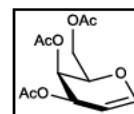
<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>[279]</sup>  $\delta$  = 170.2, 170.0, 169.8, 169.7 (C=O-Ac), 88.1 (Gal-C1), 71.0 (Gal-C5), 67.9 (Gal-C3), 67.7 (Gal-C2), 66.9 (Gal-C4), 60.8 (Gal-C6), 20.7, 20.6, 20.5, 20.5 (CH<sub>3</sub>-Ac) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[280]</sup>

### 5.2.3 3,4,6-Tri-*O*-Acetyl-D-galactal (4)<sup>[281]</sup>

Ac<sub>3</sub>Gal

Es wurden 63.6 g (0.973 mol, 10 Äq.) Zinkstaub durch Rühren in verdünnter Salzsäure aktiviert und mit destilliertem Wasser, Methanol und Essigsäureethylester gewaschen. Das so erhaltene Zink wurde in 400 mL Essigsäureethylester suspendiert, bevor 8.5 mL (8.8 g, 107 mmol, 1.1 Äq.) *N*-Methylimidazol zugetropft und das Gemisch zum Sieden erhitzt wurde. Zu der siedenden Suspension wurden binnen einer Stunde 40.0 g (97.2 mmol, 1.0 Äq.) Galactosylbromid **3** in 100 mL Essigsäureethylester zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde weitere 2 h unter Rückfluss gehalten und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur durch Hyflo<sup>®</sup> filtriert. Das Filtrat wurde mit 200 mL Salzsäure (1 M) und zweimal mit je 200 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Die Reinigung erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (cHex:EtOAc = 2:1). Ausbeute: 16.4 g (60.3 mmol, 62%) eines farblosen Feststoffs.



C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>, M = 272.25  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [272.0896].

R<sub>f</sub> (cHex:EtOAc = 1:1) = 0.62.

Smb.<sup>[282]</sup>: 32.0 – 32.4 °C.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>)<sup>[283]</sup> = - 12.0.

ESI-MS (positive, m/z)<sup>[284]</sup>: C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>Na<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup>, ber. 295.0788, gef. 295.0791.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>[213]</sup>  $\delta$  = 6.41 (dd, 1H, <sup>4</sup>J<sub>Gal-H1/Gal-H3</sub> = 1.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H1/Gal-H2</sub> = 6.3 Hz, Gal-H1), 5.52 – 5.48 (m, 1H, Gal-H3), 5.37 (dt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H4/Gal-H3</sub> = 1.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H4/Gal-H5</sub> = 4.5 Hz, Gal-H4), 4.67 (ddd, 1H, <sup>4</sup>J<sub>Gal-H2/Gal-H4</sub> = 1.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H2/Gal-H3</sub> = 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H2/Gal-H1</sub> = 6.3 Hz, Gal-H2), 4.31 – 4.25 (m, 1H, Gal-H5), 4.25 – 4.12 (m, 2H, Gal-6a,b), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>[213]</sup>  $\delta$  = 170.6, 170.3, 170.2 (3 x C=O-Ac), 145.5 (Gal-C1), 98.9 (Gal-C2), 72.9 (Gal-C5), 64.0 (Gal-C3), 63.9 (Gal-C4), 62.0 (Gal-C6), 20.9, 20.8, 20.7 (3 x CH<sub>3</sub>-Ac) ppm.

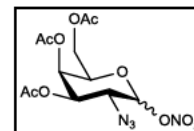
Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[284]</sup>



### 5.2.4 3,4,6-Tri-*O*-Acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha/\beta$ -D-galactosylnitrat (6a)<sup>[178]</sup>

$\alpha/\beta$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>ONO<sub>2</sub>

Es wurden 72.5 g (132 mmol, 3.0 Äq) Cer(IV)ammoniumnitrat (CAN) und 4.3 g (66 mmol, 1.5 Äq.) Natriumazid eine Stunde lang im Hochvakuum getrocknet. Acetonitril wurde mit Calciumhydrid unter Argon absolutiert. CAN wurde in 250 mL absolutem Acetonitril unter Argon suspendiert. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt, bevor das Natriumazid zugegeben wurde. Die Reaktionsmischung wurde anschließend auf -40 - -30 °C gekühlt und 12.0 g (44.0 mmol, 1.0 Äq.) Galactal **4**, gelöst in 100 mL absolutem Acetonitril, wurden zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde weitere 24 h bei -25 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch mit ca. 300 mL eiskaltem Essigsäureethylester verdünnt und mit 400 mL Eiswasser versetzt. Die organische Phase wurde dreimal mit je 200 mL Eiswasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt wurde als Anomerengemisch ( $\alpha:\beta$  = 2:1) erhalten und direkt weiter umgesetzt. Ausbeute: 16.0 g (42.5 mmol, 97%), davon 13.4 g als hellbrauner Feststoff und 2.6 g als braunes Öl.



C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>, M = 376.28  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [378.0866].

R<sub>f</sub> (cHex:EtOAc = 2:1) = 0.55.

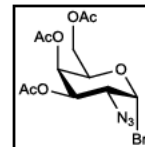
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),<sup>[285]</sup>  $\delta$  = 6.34 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H1 $\alpha$ /Gal-H2</sub> = 4.4 Hz, Gal-H1 $\alpha$ ), 5.57 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H1 $\beta$ /Gal-H2</sub> = 8.5 Hz, Gal-H1 $\beta$ ), 5.50 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H4/Gal-H3</sub> = 2.6 Hz, Gal-H4 $\alpha$ ), 5.39 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H4/Gal-H3</sub> = 2.9 Hz, Gal-H4 $\beta$ ), 5.25 (dd, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H3/Gal-H2</sub> = 11.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H3/Gal-H4</sub> = 3.3 Hz, Gal-H3 $\alpha$ ), 4.96 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H3/Gal-H2</sub> = 10.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H3/Gal-H4</sub> = 3.3 Hz, Gal-H3 $\beta$ ), 4.44 (pt, 1H, Gal-H5 $\alpha$ ), 4.20-4.02 (m, 6H, Gal-H2 $\alpha$ , Gal-H5 $\beta$ , Gal-H6 $\alpha$ (a,b), Gal-H6 $\beta$ (a,b)), 3.83 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H2/Gal-H3</sub> = 10.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H2/Gal-H1</sub> = 9.0 Hz, Gal-H2 $\beta$ ), 2.22, 2.10, 2.04 (3s, 18H, CH<sub>3</sub>-Ac ( $\alpha,\beta$ )) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[285]</sup>

### 5.2.5 3,4,6-Tri-*O*-Acetyl-2-azido-1,2-didesoxy- $\alpha$ -D-galactosylbromid (6)<sup>[175, 178]</sup>

$\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>Br

Zu einer Suspension von 24.0 g (298 mmol, 7.0 Äq.) Lithiumbromid in 50 mL absolutem Acetonitril wurde eine Lösung von 7.1 g (43 mmol, 1.0 Äq.) Azidonitrat **6a** und in 70 mL absolutem Acetonitril getropft. Die Suspension wurde 15 h gerührt, mit 200 mL Dichlormethan verdünnt und je einmal mit 50 mL Wasser und 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Die Reinigung erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (cHex:EtOAc = 1:1). Ausbeute: 7.1 g (18 mmol, 42%) eines zähen gelben Öls.



C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, M = 394.1753  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [393.0172].

R<sub>f</sub> (cHex:EtOAc = 1:1) = 0.70.

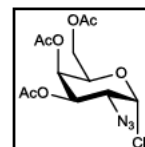
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),<sup>[178]</sup>  $\delta$  = 6.47 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H1/Gal-H2</sub> = 3.7 Hz, Gal-H-1), 5.50 (m, 1H, Gal-H-4), 5.34 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H3/Gal-H4</sub> = 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H3/Gal-H2</sub> = 10.7 Hz, Gal-H-3), 4.48 (pt, 1H, Gal-H-5), 4.20-4.07 (m, 2H, Gal-H-6a,b), 3.99 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H2/Gal-H1</sub> = 4.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Gal-H2/Gal-H3</sub> = 10.7 Hz, Gal-H-2), 2.20, 2.06, 2.05 (3s, 9H, CH<sub>3</sub>-Ac) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[178, 286]</sup>

### 5.2.6 3,4,6-Tri-*O*-Acetyl-2-azido-1,2-dideoxy- $\alpha$ -D-galactosylchlorid (5)<sup>[162]</sup>

$\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>Cl

D-Galactal **4** (4.96 g, 18.2 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 150 mL Acetonitril gelöst und auf -20 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 3.94 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (14.6 mmol, 0.8 Äq.), 1.30 g NaN<sub>3</sub> (20.0 mmol, 1.1 Äq.) und 2.10 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33%ig, 364 mmol, 20.0 Äq.) zugegeben und die Suspension wurde 16 h lang gerührt. Nach Reaktionskontrolle wurden weitere 1.97 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (7.29 mmol, 0.3 Äq.), 0.47 g NaN<sub>3</sub> (7.23 mmol, 0.4 Äq.) und 0.76 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33%, 13 mmol, 0.4 Äq.) zugegeben und es wurde weitere 5 d gerührt. Nach vollständigem Umsatz des Edukts wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde mit 50 mL Wasser und 100 mL Ethylacetat versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde zweimal mit je 75 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen



Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (cHex:EtOAc = 2:1) gereinigt. Ausbeute: 3.62 g (10.4 mmol, 57%) eines blass gelben Öls.

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_7$ ,  $M = 349.72 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [349.0677].

$R_f$  (cHex:EtOAc = 1:1) = 0.81.

HR-ESI-MS (positiv, m/z):<sup>[162]</sup>  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{ClN}_4\text{O}_7^+$ ,  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , ber. 367.1015, gef. 367.1016.

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[162]</sup>  $\delta$  = 6.14 (d, 1H,  $^3J_{\text{Gal-H1/Gal-H2}}$ =3.8 Hz, Gal-H1), 5.47 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Gal-H4/Gal-H3}}$  = 1.4 Hz,  $^3J_{\text{Gal-H4/Gal-H5}}$ =3.2 Hz, Gal-H4), 5.38 – 5.30 (m, 1H, Gal-H3), 4.54 – 4.44 (m, 1H, Gal-H2), 4.19 – 4.00 (m, 3H, Gal-H6a,b, Gal-H5), 2.21 – 2.11 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ -Ac), 2.09 – 1.97 (m, 6H,  $\text{CH}_3$ -Ac) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[162]</sup>  $\delta$  = 170.2, 169.7, 169.5 (C=O-Ac), 92.6 (Gal-C1), 69.7 (Gal-C6), 68.7 (Gal-C5), 66.7 (Gal-C3), 60.9 (Gal-C4), 58.5 (Gal-C2), 20.6, 20.5, 20.5 ( $\text{CH}_3$ -Ac) ppm.

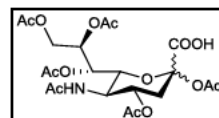
Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[162]</sup>

### 5.3 Synthesen zu 4.2 – Sialinsäurebausteine

#### 5.3.1 5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galactononulopyranosid (8)<sup>[185-186]</sup>

$\alpha/\beta$ Ac<sub>5</sub>NAcNeuCOOH

Es wurden 17.5 g (56.6 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure 7 in 250 mL Pyridin und 120 mL Essigsäureanhydrid bei 0 °C gelöst und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 50 mL Toluol und anschließend mit zweimal mit je 50 mL Dichlormethan kodestilliert. Ausbeute: 29.4 g (56.6 mmol, quant.) eines hellbraunen zähflüssigen Öls. Das Produkt wurde roh umgesetzt.



C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>14</sub>, M = 519.45  $\frac{g}{mol}$ , [519.1588].

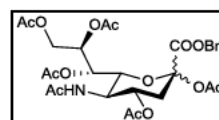
R<sub>f</sub> (EtOAc:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 5:1) = 0.36.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[287-288]</sup>

#### 5.3.2 Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galactononulopyranosid (9)<sup>[187-188]</sup>

$\alpha/\beta$ Ac<sub>4</sub>NAcNeuCOOBn

Zu einer Lösung von 29.4 g (56.6 mmol, 1.0 Äq.) peracetylierter *N*-Acetylneuraminsäure 8 in 50 mL Ethanol und 10 mL Wasser wurden 10.1 g (31.0 mmol, 0.6 Äq.) Cäsiumcarbonat gegeben. Die Lösung wurde nach beendeter Gasentwicklung noch weitere 30 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 20 mL Toluol kodestilliert. Der ölige Rückstand wurde in 150 mL DMF aufgenommen und unter Eiskühlung wurden 20.2 mL (170 mmol, 3.0 Äq.) Benzylbromid zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mit 100 mL Ethylacetat verdünnt und das Cäsiumbromid wurde abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (EtOAc). Ausbeute: 24.2 g (45.4 mmol, 92%) eines farblosen amorphen Feststoffs.



C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>14</sub>, M = 609.58  $\frac{g}{mol}$ , [609.2058].

$R_f(\text{EtOAc}) = 0.43$ .

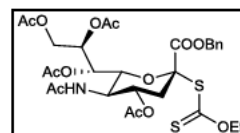
$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[289]</sup>  $\delta = 7.38 - 7.32$  (m, 5H, Bn-H), 5.56 – 5.03 (m, 6H, Sia-H4, Sia-H6, Sia-H7, Sia-H8, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.44 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Sia-9a/Sia-8}} = 2.7$  Hz,  $^2J_{\text{Sia-9a/Sia-9b}} = 12.3$  Hz, Sia-H9a), 4.19 – 4.05 (m, 2H, Sia-9b, Sia-H5), 2.54 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Sia-3\ddot{a}q/Sia-4}} = 5.1$  Hz,  $^2J_{\text{Sia-3\ddot{ä}q/Sia-3ax}} = 13.4$  Hz, Sia-H3\ddot{ä}q), 2.16 – 2.04 (m, 7H, 2 CH<sub>3</sub>-Ac, Sia-H3ax), 2.01 (s, 9H, 3 CH<sub>3</sub>-Ac), 1.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[290]</sup>

### 5.3.3 *O*-Ethyl-*S*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl) onat)-dithiocarbonat (11)<sup>[159-161]</sup>

$\alpha\text{Ac}_4\text{NAcNeuCOOBnXan}$

Eine auf 0 °C gekühlte Lösung von 38.1 g (42.4 mmol, 1.0 Äq.) Benzylester **9** in 65.5 mL Acetylchlorid wurde vorsichtig mit 0.65 mL Wasser versetzt und 4 d bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Acetylchlorid wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde fünfmal mit je 50 mL Toluol und dreimal mit je 50 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde in 400 mL Ethanol aufgenommen und mit 12.2 g (76.1 mmol, 1.8 Äq.) Kaliummethylxanthogenat versetzt und weitere 48 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 300 mL Dichlormethan verdünnt und die organische Phase wurde dreimal mit je 200 mL gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (cHex:EtOAc = 1:7). Ausbeute: 18.1 g (26.9 mmol, 64% (2 Stufen)) eines blassgelben amorphen Feststoffs.



$\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_{14}\text{S}_2$ ,  $M = 655.67 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [671.1706].

$R_f(\text{EtOAc}) = 0.45$ .

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[161]</sup>  $\delta = 7.29 - 7.23$  (m, 5H, Bn-H), 6.05 (d, 1H,  $^3J_{\text{Sia-NH/Sia-H3\ddot{ä}q}} = 10.1$  Hz, Sia-NH), 5.32 – 5.00 (m, 4H, Sia-H7, Sia-H8, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.78 (td, 1H,  $^3J_{\text{Sia-H4/Sia-H5}} = 4.7$  Hz,  $^3J_{\text{Sia-H4/Sia-H3}} = 11.3$  Hz, Sia-H4), 4.61 – 4.51 (m, 1H, Sia-H6), 4.39 – 3.92 (m, 6H, Sia-H9a,b, Sia-H5, Sia-H4, Et-CH<sub>2</sub>), 2.59 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Sia-H3\ddot{ä}q/Sia-H4}} = 5.1$  Hz,  $^2J_{\text{Sia-H3\ddot{ä}q/Sia-H3ax}} = 13.4$  Hz, Sia-H3\ddot{ä}q), 2.05 – 1.75 (m, 16H, CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH, Sia-H3ax), 1.17, 1.11 (2 t, 3H,  $^3J_{\text{Et-CH3/Et-CH2}} = 7.1$  Hz, CH<sub>3</sub>-Et) ppm.

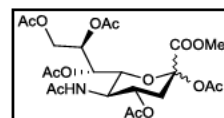


Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[161]</sup>

### 5.3.4 Methyl-5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galactononulopyranosid (13)

$\alpha/\beta$ Ac<sub>5</sub>NACCOOMe

Zu einer Suspension von 20.0 g des Ionentauschers Dowex-ACR in 500 mL Methanol p.a. wurden 15.3 g (49.5 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure **7** gegeben. Die Suspension wurde 4 h auf 60 °C erwärmt, bis die Sialinsäure vollständig gelöst war. Der Ionentauscher wurde abfiltriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde in 250 mL Pyridin und 120 mL Essigsäureanhydrid aufgenommen und 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 50 mL Toluol und zweimal mit je 50 mL Dichlormethan kdestilliert. Die Reinigung erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (EtOAc). Ausbeute 24.2 g (45.4 mmol, 92%) eines hellbraunen Öls.



C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>14</sub>, M = 533.48  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [533.1745].

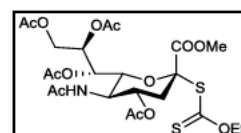
R<sub>f</sub> (EtOAc) = 0.53 ( $\alpha$ -Anomer) bzw. 0.45 ( $\beta$ -Anomer).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[291]</sup>

### 5.3.5 *O*-Ethyl-S-(methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl) onat)-dithiocarbonat (14)<sup>[187-188]</sup>

$\alpha$ Ac<sub>4</sub>NACNeuCOOMeXan

Ein gekühltes Gemisch aus 72 mL Acetylchlorid und 0.73 mL Wasser wurde zu 24.2 g (45.4 mmol) Sialinsäureester **13** gegeben und die Reaktionslösung wurde 4 d lang gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 50 mL Toluol und zweimal mit je 50 mL Dichlormethan kdestilliert. Das Produkt wurde roh umgesetzt.



R<sub>f</sub> (EtOAc) = 0.45.



Das Chlorid **10a** wurde in 150 mL Ethanol gelöst und die Lösung anschließend mit 12.3 g (76.8 mmol, 1.7 Äq.) Kaliumxanthogenat versetzt. Die Lösung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 200 mL Dichlormethan verdünnt und dreimal mit je 150 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt. (cHex:EtOAc = 1:4 → EtOAc). Ausbeute: 16.3 g (28.1 mmol, 62%) eines blassgelben amorphen Feststoffs.

$\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_{13}\text{S}_2$ ,  $M = 595.64 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [595.1393].

$^1\text{H}$ -NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $^{[207]}\delta = 5.91$  (d, 1H,  $^3J_{\text{Sia-NH/Sia-H5}} = 9.7$  Hz, Sia-NH), 5.88, 5.29 – 5.17 (m, 2H, Sia-H7, Sia-H8), 4.86 – 3.91 (m, 7H, Sia-H9a,b, Sia-H6, Sia-H5, Sia-H4, Et- $\text{CH}_2$ ), 3.72 (s, 3H, *O*- $\text{CH}_3$ ), 2.55 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Sia-H3äq/Sia-H4}} = 4.8$  Hz,  $^2J_{\text{Sia-H3äq/Sia-H3ax}} = 13.0$  Hz, Sia-H3äq), 2.06, 2.05 (2 s, 6H,  $\text{CH}_3$ -Ac,  $\text{CH}_3$ -AcNH), 2.01 – 1.91 (m, 7H,  $\text{CH}_3$ -Ac, Sia-H3ax), 1.81 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -Ac), 1.29, 1.18 (2 t, 3H,  $^3J_{\text{Et-CH3/Et-CH2}} = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Et) ppm.

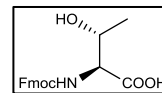
Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[207]</sup>

## 5.4 Synthesen zu 4.3 – $\beta^3$ -homo-Threonin-Glycokongulate

### 5.4.1 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin(16)<sup>[191]</sup>

Fmoc-Thr-OH

Zu einer Lösung aus 20.0 g (168 mmol, 1.0 Äq.) L-Threonin **15** und 14.1 g (168 mmol, 1.0 Äq.) Natriumhydrogencarbonat in 800 mL eines Gemisches aus Aceton und Wasser ( $v/v = 1/1$ ) wurden portionsweise 56.6 g (168 mmol, 1.0 Äq.) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-succinimidyl-carbonat eingetragen, und das Gemisch wurde 24 h gerührt. Man säuerte mit konz. Salzsäure auf pH 2 an und destillierte das Aceton im Vakuum ab. Das Produkt wurde durch dreimaliges Waschen mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert und die organische Phase wurde zweimal mit je 200 mL verdünnter Salzsäure (1 M) und 200 mL Wasser gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde dreimal mit absolutem Toluol und zweimal mit Dichlormethan kodestilliert. Ausbeute: 57.4 g (168 mmol, quant.) eines blassgelben amorphen Feststoffs. Das Produkt wurde roh umgesetzt.



$C_{19}H_{19}NO_5$ ,  $M = 341.36 \frac{g}{mol}$ , [341.1263].

$[a]_D^{25}$  ( $c = 1.00$ ,  $CHCl_3$ )<sup>[292]</sup> = -7.94.

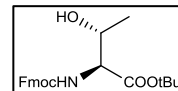
$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )<sup>[293]</sup>  $\delta = 7.72$  (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H4/Fmoc-H3} = ^3J_{Fmoc-H5/Fmoc-H6} = 7.4$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.58-7.55 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.34 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H3/Fmoc-H4} = ^3J_{Fmoc-H3/Fmoc-H2} = ^3J_{Fmoc-H6/Fmoc-H5} = ^3J_{Fmoc-H6/Fmoc-H7} = 7.4$  Hz, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.28 – 7.24 (m, 2H, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 6.05 (d, 1H,  $^3J_{Thr-NH/Thr-H2} = 9.2$  Hz, Thr-NH), 5.84 (bs, 2H, OH, COOH), 4.45-4.43 (m, 2H, Thr-H2, Thr-H3), 4.36 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-CH2/Fmoc-H9} = 7.7$  Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.17 (t, 1H,  $^3J_{Fmoc-H9/Fmoc-CH2} = 7.0$  Hz, Fmoc-H9), 1.23 (d, 3H,  $^3J_{Thr-CH3/Thr-H3} = 6.2$  Hz, Thr-H4) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[292-293]</sup>

### 5.4.2 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl-L-threonin-*tert*.-butylester (17)<sup>[158, 163-164]</sup>

Fmoc-Thr-*Ot*Bu

Es wurden 21.8 g (105 mmol, 1.2 Äq.) Dicyclohexylcarbodiimid, 7.82 g (105 mmol, 1.2 Äq.) *tert*.-Butanol und 0.87 g (8.8 mmol, 0.1 Äq.) wasserfreies Kupfer(I)chlorid unter Argon und Lichtausschluss 4 d gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 30 mL frisch destilliertem absolutem Dichlormethan verdünnt. Binnen einer Stunde wurden 30.0 g (88.0 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-Thr-OH **16**, gelöst in 60 mL absolutem Dichlormethan, hinzuge tropft. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und eine weitere Stunde gerührt (Reaktionskontrolle!). Der entstandene Harnstoff wurde abfiltriert und der Filterkuchen wurde mehrmals mit eiskaltem Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, bis die wässrige Phase nicht mehr blau gefärbt war. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Die Reinigung erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (cHex:EtOAc = 3:1  $\rightarrow$  2:1). Ausbeute: 22.6 g (57.0 mmol, 65%) eines blass gelben amorphen Feststoffs.



$C_{23}H_{27}NO_3$ ,  $M = 397.46 \frac{g}{mol}$ , [397.1889]

Smb.: 79.8 – 81.8 °C.

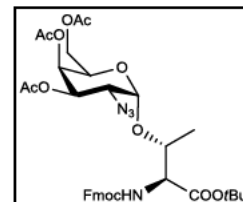
$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),<sup>[294-295]</sup>  $\delta$  = 7.77 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H4/Fmoc-H3} = ^3J_{Fmoc-H5/Fmoc-H6} = 7.7$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.62 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H1/Fmoc-H2} = ^3J_{Fmoc-H8/Fmoc-H7} = 7.4$  Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.40 (t, 2H,  $^3J_{Fmoc-H3/Fmoc-H2} = ^3J_{Fmoc-H3/Fmoc-H4} = ^3J_{Fmoc-H6/Fmoc-H5} = ^3J_{Fmoc-H6/Fmoc-H7} = 7.4$  Hz, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.29 (t, 2H,  $^3J_{Fmoc-H2/Fmoc-H3} = ^3J_{Fmoc-H2/Fmoc-H1} = ^3J_{Fmoc-H7/Fmoc-H6} = ^3J_{Fmoc-H7/Fmoc-H8} = 7.4$  Hz, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 5.58 (d, 1H,  $^3J_{Thr-NH/Thr-H2} = 8.9$  Hz, Thr-NH), 4.41 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H9/Fmoc-CH2} = 7.0$  Hz, Fmoc-H9), 4.24 (t, 1H,  $^3J_{Fmoc-CH2/Fmoc-H9} = 7.0$  Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>a), 4.16-4.04 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>b, Thr-H2, Thr-H3), 2.05 (s, 1H, OH), 1.49 (s, 9H, *t*Bu-CH<sub>3</sub>), 1.25 (d, 3H,  $^3J_{Thr-H4/Thr-H3} = 7.0$  Hz, Thr-H4) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[294-295]</sup>

### 5.4.3 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*.-butylester (18)<sup>[158]</sup>

Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>)-OtBu

Threonin-*tert*.-butylester **17**, Azidobromid<sup>f</sup> **6** und Silbercarbonat wurden drei Stunden im Hochvakuum getrocknet. Gepulvertes Molsieb 4 Å wurde im Hochvakuum drei Stunden lang ausgeheizt und Silberperchlorat wurde fünfmal mit absolutem Toluol kodestilliert.



Es wurden 19.4 g Molsieb (gepulvert, 4 Å) in 60 mL absolutem Toluol unter Argon aufgeschlämmt und mit einer Lösung von 7.41 g (18.7 mmol, 1.1 Äq.) Threonin-*tert*.-butylester **17**, gelöst in 75 mL absolutem Dichlormethan, versetzt. Nachdem eine Stunde unter Argon gerührt wurde, wurden nacheinander bei 0 °C Silbercarbonat und Silberperchlorat, letzteres in 15 mL absolutem Toluol gelöst, im Argongegenstrom zugegeben. Es wurde weitere 30 min unter Lichtausschluss bei 0 °C gerührt, bevor 7.00 g (17.8 mmol, 1.0 Äq.) Azidobromid<sup>f</sup> **6**, gelöst in 150 mL eines Lösungsmittelgemisches aus absolutem Dichlormethan und Toluol (v/v = 1:1), bei 0 °C langsam zugetropft wurden. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 24 Stunden lang unter Lichtausschluss gerührt (Reaktionskontrolle). Die erhaltene Suspension wurde mit 200 mL Dichlormethan verdünnt und durch Hyflo® filtriert. Das Filtrat wurde zweimal mit je 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat- bzw. gesättigter Natriumchlorid-lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc = 10:1), wobei geringe Mengen des entstandenen  $\beta$ -Anomeren abgetrennt wurden. Ausbeute: 8.45 g (11.9 mmol, 67%) eines blassgelben amorphen Feststoffs.

C<sub>35</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>, M = 710.73  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [710.2799].

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc = 10:1) = 0.7.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),<sup>[158]</sup>  $\delta$  = 7.77 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H4/Fmoc-H3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H5/H6</sub> = 7.4 Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.63 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H1/Fmoc-H2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H8/H7</sub> = 7.4 Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.40 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H3/Fmoc-H2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H3/Fmoc-H4</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H6/Fmoc-H5</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H6/Fmoc-H7</sub> = 7.4 Hz, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.36-7.29 (m, 2H, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 5.66 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Thr-NH/Thr-H2</sub> = 9.6 Hz, Thr-NH), 5.47 (m, 1H, GalNAc-H4), 5.34 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalN3-H3/GalN3-</sub>

<sup>f</sup> Diese Reaktion wurde ebenfalls mit Azidochlorid **5** durchgeführt. Die Ausbeuten und Selektivitäten bezogen auf die Bildung von Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>)-OtBu waren vergleichbar.

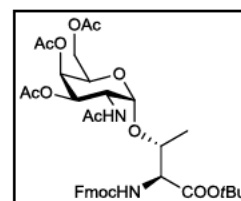
$H_4 = 3.3$  Hz,  $^3J_{\text{GalN3-H3/GalNN-H2}} = 11.0$  Hz, GalNAc-H3), 5.11 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1/GalN3-H2}} = 3.7$  Hz, GalNAc-H1), 4.46 – 4.28 (m, 6H, Fmoc-H9, Thr-H2, Thr-H3, GalNAc-H5, GalNAc-H6a,b), 4.10 (d, 2H,  $J_{\text{Fmoc-H9/Fmoc-CH2}} = 6.4$  Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 3.64 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H1}} = 3.3$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H3}} = 11.0$  Hz, GalN<sub>3</sub>-H2), 2.15, 2.05, 2.04 (3 s, 9H, CH<sub>3</sub>-AcNH, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.47 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 1.36 (d, 3H,  $J_{\text{Thr-H4/Thr-H3}} = 6.6$  Hz, Thr-H4) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[158, 162]</sup>

#### 5.4.4 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert.*-butyl-ester (19)<sup>[190, 294, 296]</sup>

Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-*O**t*Bu

Es wurden 1.61 g (23.6 mmol, 9.9 Äq.) Zinkstaub durch Waschen mit einer wässrigen Kupfer(II)sulfatlösung (5%ig) aktiviert. Der aktivierte Zinkstaub wurde daraufhin mit destilliertem Wasser, Essigsäureethylester und Diethylether gewaschen. In 96 mL eines Lösungsmittelgemischs ( $v/v/v = 3:2:1$ ) aus Tetrahydrofuran, Essigsäureanhydrid und Essigsäure wurden 1.70 g (2.39 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>)-*O**t*Bu **18** gelöst. Die Lösung wurde mit dem aktivierten Zink versetzt und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Verdünnen der Suspension mit 100 mL Tetrahydrofuran wurde durch Hyflo® filtriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde fünfmal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde in 100 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 20 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat- sowie zweimal mit je 20 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte durch Flsh-Säulenchromatographie an Kieselgel (cHex:EtOAc = 2:1  $\rightarrow$  1:1). Ausbeute: 1.81 g (2.49 mmol, 98%) eines farblosen amorphen Feststoffs.



$C_{37}H_{46}N_2O_{13}$ ,  $M = 726.77 \frac{g}{mol}$ , [726.3000].

$R_f$  (cHex:EtOAc = 1:1) = 0.18.

Smb.: 184.4 – 185.5 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[294]</sup>  $\delta = 7.78$  (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H4/Fmoc-H3}} = ^3J_{\text{Fmoc-H5/H6}} = 7.7$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.64 (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H1/H2}} = ^3J_{\text{Fmoc-H8/H7}} = 7.4$  Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.41 (pt, 2H, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.33 (pt, 2H, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 6.03 (d, 1H,  $J_{\text{Thr-NH/Thr-H3}} = 9.6$  Hz, Thr-NH), 5.56 (d, 1H,  $^3J_{\text{AcNH/GalNAc-H2}} = 9.2$  Hz, AcNH), 5.39 (bs, 1H, GalNAc-H4), 5.09 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H4}} = 2.8$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H2}} = 11.2$  Hz, GalNAc-H3), 4.89 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1/GalNAc-H2}} = 3.3$  Hz, GalNAc-H1), 4.65-4.59 (m, 1H, GalNAc-H2), 4.46 (pt, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.29-4.08 (m, 6H, Thr-H2, Thr-H3, GalNAc-H6a,b, Fmoc-H9, GalNAc-H5), 2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 2.04, 2.00 (2 s, 3H, 6H, 3 CH<sub>3</sub>-Ac), 1.46 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 1.32 (d, 3H,  $^3J_{\text{Thr-H3/Thr-H4}} = 6.3$  Hz, Thr-H4) ppm.

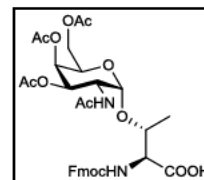
$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, HSQC, HMBC,  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[158]</sup>  $\delta = 170.9, 170.6, 170.3, 170.0$  (CH<sub>3</sub>-AcNH, 2 C=O-Ac, Thr-C1, 1 C=O-Ac-Signal fehlt durch Überlagerung), 156.5 (C=O, Urethan), 143.7 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.3 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 127.8 (Fmoc-C3, Fmoc-C6), 127.1 (Fmoc-C2, Fmoc-C7), 125.1 Fmoc-C1, 125.0 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 120.0 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 99.9 (GalNAc-C1), 83.3 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 77.2 (Thr-C3), 68.7 (GalNAc-C3), 67.4 (GalNAc-C4, GalNAc-C5), 67.3 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 62.1 (GalNAc-C6), 58.9 (Thr-C2), 47.4 (GalNAc-C2), 47.1 (Fmoc-C9), 28.1 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 23.2 (CH<sub>3</sub>-AcNH), 20.8, 20.7, 20.6 (3 x CH<sub>3</sub>-Ac), 18.6 (Thr-C4) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[158, 297]</sup>

#### 5.4.5 *N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin (**19a**)<sup>[165, 298]</sup>

Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH

In einer Mischung aus 2 mL Anisol und 2 mL TFA wurden 0.50 g (0.69 mmol) Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-*O**t*Bu **19** sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man verdünnte mit 5 mL Toluol und destillierte das Lösungsmittelgemisch im Vakuum ab. Der Rückstand wurde fünfmal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kdestilliert.



Rohausbeute: 0.45 g (0.67 mmol, 98%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

$\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{13}$ ,  $M = 670.66 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [670.2374].

Smb.: 124.9-126.3 °C.

ESI-MS (positiv,  $m/z$ ).<sup>[269]</sup>  $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{Na}^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 693.23, gef. 693.27,  $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{K}^+$ ,  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber. 709.20, gef. 709.22.

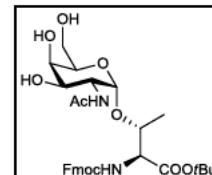


Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[297]</sup>

#### 5.4.6 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (20)<sup>[158]</sup>

Fmoc-Thr( $\alpha$ GalNAc)-*O**t*Bu

Eine Lösung aus 1.80 g (2.48 mmol) Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-*O**t*Bu **19** in 10 mL abs. Methanol wurde unter Argonatmosphäre so lange mit einer frisch hergestellten Natriummethanolatlösung (1%ig in Methanol) versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht war. Der pH-Wert wurde jede Stunde kontrolliert und ggf. durch Zugabe weiterer Natriummethanolatlösung reguliert. Nach 7 h wurde die Reaktionslösung durch Zusatz von konzentrierter Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (EtOAc:MeOH = 10:1). Ausbeute 1.18 g (1.96 mmol, 79%) eines farblosen amorphen Feststoffs.



$C_{31}H_{40}N_2O_{10}$ ,  $M = 600.66 \frac{g}{mol}$ , [600.2683].

$R_f$  (EtOAc:MeOH = 10:1) = 0.23.

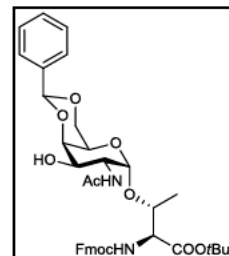
ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $C_{31}H_{40}N_2O_{10}Na^+$ ,  $[M+Na]^+$ , ber. 623.26, gef. 623.27.

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),<sup>[158]</sup>  $\delta$  = 7.73 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H4/Fmoc-H3} = ^3J_{Fmoc-H5/Fmoc-H6} = 3.5$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.59 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H1/Fmoc-H2} = ^3J_{Fmoc-H7/Fmoc-H8} = 3.5$  Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.35 – 7.23 (m, 4H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7), 5.90 (m, 1H, Thr-NH), 5.30 (dd, 1H  $^3J_{GalNAc-H3/GalNAc-H4} = 3.0$  Hz,  $^3J_{GalNAc-H3/GalNAc-H2} = 10.2$  Hz, GalNAc-H3), 4.80 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H1/GalNAc-H2} = 3.2$  Hz, GalNAc-H1), 4.3 – 4.36 (m, 1H, Thr-H3), 4.30 – 4.27 (m, 2H, GalNAc-H6a,b), 4.22 – 4.17 (m, 3H, GalNAc-H5-Fmoc-H9, Thr-H2), 4.04 – 3.95 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 3.79 (m, 1H, GalNAc-H2), 202. (s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.42 (bs, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 1.23 (d, 3H,  $^3J_{Thr-H3/Thr-H4} = 6.3$  Hz, Thr-H4) ppm.

### 5.4.7 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butyl-ester (**23**)<sup>[165, 299]</sup>

Fmoc-Thr( $\alpha$ -4,6-Bnz-GalNAc)-OtBu

Es wurden 2.71 g (4.51 mmol, 1.0 Äq.) deblockiertes Tn-Antigen **20** in 75 mL Acetonitril gelöst und mit 1.36 mL (9.06 mmol, 2.0 Äq.) Benzaldehyddimethylacetal und einer Spatelspitze *para*-Toluolsulfonsäure versetzt (pH  $\sim$  3.5). Die Lösung wurde 3 h auf 50 °C erwärmt (DC-Kontrolle), mit DIPEA neutralisiert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (cHex:EtOAc = 1:4). Ausbeute: 2.42 g (3.51 mmol, 78%) eines farblosen amorphen Feststoffs.



$C_{38}H_{44}N_2O_{10}$ ,  $M = 688.75 \frac{g}{mol}$ , [688.2996].

R<sub>f</sub> (cHex: EtOAc = 1: 4) = 0.41.

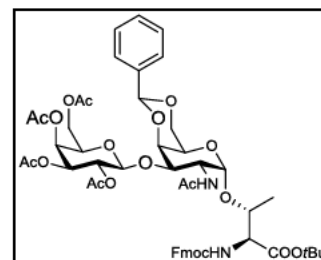
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),<sup>[208]</sup>  $\delta$  = 7.77 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H4/Fmoc-H3} = ^3J_{Fmoc-H5/Fmoc-H6} = 7.5$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.62 (d,  $^3J_{Fmoc-H1/Fmoc-H2} = ^3J_{Fmoc-H8/Fmoc-H7} = 7.2$  Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8 ), 7.56 – 7.48 (m, 2H, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.46 – 7.27 (m, 7H, Fmoc-H2, Fmoc-H7, Bnz-H), 6.52 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-NH/GalNAc-H2} = 8.4$  Hz, GalNAc-NH), 5.62 (d, 1H,  $^3J_{Thr-NH/Thr-H2} = 9.4$  Hz, Thr-NH), 5.55 (s, 1H, Bnz-CH), 4.95 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H1/GalNAc-H2} = 3.0$  Hz, GalNAc-H1), 4.61 – 4.36 (m, 3H, GalNAc-H2, GalNAc-H6a,b), 4.31 – 4.16 (m, 5H, Thr-H2, Fmoc-H9, Fmoc-CH<sub>2</sub>a GalNAc-H5, Thr-H3), 4.05 (d, 1H,  $^2J_{Fmoc-CH2a/Fmoc-CH2b} = 11.9$  Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>b), 3.92 – 3.79 (m, 1H, GalNAc-H3), 3.73 – 3.61 (m, 1H, GalNAc-H4), 3.40 (bs, 1H, OH), 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.46 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 1.29 (d, 3H,  $^3J_{Thr-H4/GalNAc-H3} = 5.5$  Hz, Thr-H4) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),<sup>[208]</sup>  $\delta$  = 172.5, 170.8 (C=O-AcNH, Thr-C1), 156.6 (C=O, Urethan), 143.8 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.4 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 137.6 (Bzn-C<sup>q</sup>), 129.2, 128.3 (Bzn-C), 127.9, 127.9 (Fmoc-C3, Fmoc-C6), 127.2 (Fmoc-C2, Fmoc-C7), 126.5 (Bzn-C), 125.1 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 120.2, 120.1 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 101.3 (Bnz-CH), 100.6 (GalNAc-C1), 83.5 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 77.4 (Thr-C3), 75.6 (GalNAc-C5), 69.8 (GalNAc-C3), 69.3 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 67.3 (GalNAc-C6), 63.8 (GalNAc-C4), 59.1 (Thr-C2), 50.5 (GalNAc-C2), 47.3 (Fmoc-C9), 28.2 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 23.2 (CH<sub>3</sub>-AcNH), 21.1, 19.1 (Thr-C4) ppm.

### 5.4.8 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert.*-butylester (24)<sup>[300]</sup>

Fmoc-Thr( $\beta$ Ac<sub>4</sub>Gal(1 $\rightarrow$ 3) $\alpha$ 4,6BznGalNAc)-*O**t*Bu

In einer Suspension aus 50 mL Dichlormethan/Nitromethan (*v/v* = 3:1) und 2.55 g Molsieb (4 Å) wurden 3.80 g (5.51 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-Thr( $\alpha$ -4,6-Bzn-GalNAc)-*O**t*Bu **23** und 4.71 g (11.5 mmol, 2.1 Äq.)  $\alpha$ Ac<sub>4</sub>GalBr **3** gelöst und 30 min gerührt, bevor die Suspension mit 1.92 g (7.60 mmol, 1.4 Äq.) Quecksilber(II)cyanid versetzt wurde. Die



Reaktionsmischung wurde 2.5 h gerührt und nochmals mit 1.92 g (7.60 mmol, 1.4 Äq.) Quecksilber(II)cyanid versetzt. Die Suspension wurde weitere 16 h gerührt, bevor durch Hyflo<sup>®</sup> filtriert wurde. Das Filtrat wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und dreimal mit je 15 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (cHex:EtOAc = 1:1) gereinigt. Ausbeute: 3.81 g (3.74 mmol, 68%) eines farblos amorphen Feststoffs.

$C_{52}H_{62}N_2O_{19}$ ,  $M = 1019.05 \frac{g}{mol}$ , [1018.3947].

$R_f$  (cHex:EtOAc = 1:1) = 0.31.

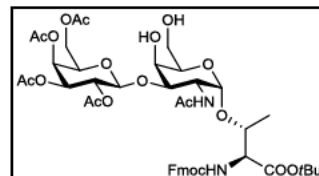
NMR und ESI-MS lieferten keine Ergebnisse.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[301]</sup>

#### 5.4.9 *N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert.*-butylester (24a)<sup>[165]</sup>

Fmoc-Thr( $\beta$ Ac<sub>4</sub>Gal(1 $\rightarrow$ 3) $\alpha$ GalNAc)-*O**t*Bu

Eine Lösung von 1.10 g (1.08 mmol) Fmoc-Thr( $\beta$ Ac<sub>4</sub>Gal(1 $\rightarrow$ 3) $\alpha$ 4,6BznGalNAc)-*O**t*Bu **24** in 40 mL 80%-iger Essigsäure wurde solange auf 60 °C erwärmt, bis das Edukt vollständig umgesetzt war (DC-Kontrolle). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (cHex:EtOAc = 1:5). Ausbeute: 664 mg (0.713 mmol, 66%) eines blass gelben Öls.



C<sub>45</sub>H<sub>58</sub>N<sub>2</sub>O<sub>19</sub>, M = 930.94  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [930.3634].

R<sub>f</sub>(cHex:EtOAc = 1:5) = 0.10.

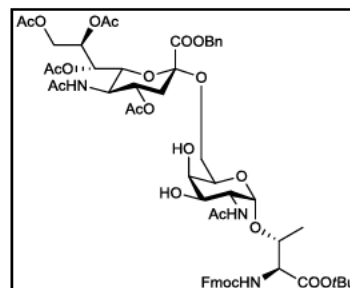
ESI-MS (positiv, m/z): C<sub>45</sub>H<sub>59</sub>N<sub>2</sub>O<sub>19</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup>, ber. 931.3707, gef. 931.3702.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[165]</sup>

#### 5.4.10 *N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert.*-butylester (21)<sup>[158]</sup>

Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NacNeuCOOBn(2 $\rightarrow$ 6) $\alpha$ GalNAc)-*O**t*Bu

Methylsulphenylbromidlösung 1.6 M in 1,2-Dichlorethan: Es wurden 410  $\mu$ L (8.00 mmol) Brom zu einer Lösung aus 709  $\mu$ L (8.00 mmol) Dimethylsulfid in 10 mL abs. 1,2-Dichlorethan getropft und 18 h unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt.



Es wurden 700 mg (1.16 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-Thr( $\alpha$ GalNAc)-*O**t*Bu **20** und 2.62 g (3.94 mmol, 3.3 Äq.) des Sialinsäuredonors **11** in 30 mL einer Mischung aus absolutem Acetonitril und Dichlormethan (v/v = 2:1) über 2 g Molsieb (4 Å) vorgelegt und 1 h gerührt, bevor 1.00 g (3.89 mmol, 3.3 Äq.) trockenes Silbertriflat zugegeben wurden. Die Lösung wurde auf -65 °C gekühlt und es wurden 2.45 mL der auf 0 °C gekühlten Methylsulphenylbromidlösung zugetropft. Nach 6 h



Reaktionszeit wurde die Mischung mit 0.8 mL (4.8 mmol, 4.1 Äq.) DIPEA neutralisiert. Die Reaktionsmischung wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und durch Hyflo® filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (EtOAc:EtOH = 20:1). Ausbeute 913 mg (0.794 mmol, 68%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

$C_{57}H_{71}N_3O_{22}$ ,  $M = 1150.18 \frac{g}{mol}$ , [1149.4529].

$R_f$  (EtOAc:EtOH = 20:1) = 0.25.

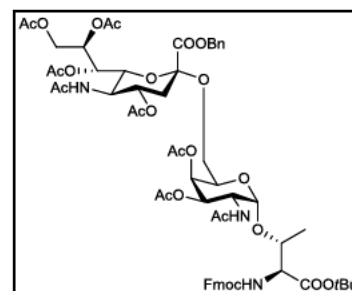
ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $C_{57}H_{71}N_3O_{22}Na^+$ ,  $[M+Na]^+$ , ber. 1172.44, gef. 1172.42.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[158, 166]</sup>

#### 5.4.11 *N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*.-butylester (22)<sup>[166]</sup>

Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NAcNeuCOOBn(2→6) $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-*Or*Bu

Zur Acetylierung wurden 913 mg (0.794 mmol, 1.0 Äq.) in 20 mL Pyridin und 10 mL Essigsäureanhydrid gelöst und mit 10 mg DMAP (82  $\mu$ mol, 0.1 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Lösung mit Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Der Rückstand wurde mehrmals mit Toluol kdestilliert. Die Reinigung des Produkts erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (EtOAc: EtOH = 20:1). Ausbeute: 830 mg (0.67 mmol, 85%), eines farblosen amorphen Feststoffs.



$C_{61}H_{75}N_3O_{24}$ ,  $M = 1234.23 \frac{g}{mol}$ , [1233.4741].

$R_f$  (EtOAc: EtOH = 20:1) = 0.55.

HR-ESI-MS (positiv,  $m/z$ )<sup>[302]</sup>:  $C_{61}H_{76}N_3O_{24}^+$ ,  $[M+H]^+$ , ber. 1234.4813, gef. 1234.4811.

$^1H$ -NMR (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $CDCl_3$ )<sup>[302]</sup>  $\delta$  = 7.79 – 7.74 (m, 2H, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.68 – 7.48 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.46 – 7.28 (m, 9H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7, 5 Bn-H), 5.96 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-NH/GalNAc-H2} = 9.9$  Hz, GalNAc-NH), 5.62 (d, 1H,  $^3J_{Thr-NH/Thr-H2} = 9.3$  Hz, Thr-NH), 5.39 – 5.07 (m, 5H, Sia-H7, Sia-H8, Bn-CH<sub>2</sub>a, GalNAc-H4, Bn-CH<sub>2</sub>b), 4.97 (dd, 1H,  $^3J_{GalNAc-H3/GalNAc-H4} = 3.2$  Hz,  $^3J_{GalNAc-H3/GalNAc-H2} = 11.3$  Hz, GalNAc-H3), 4.84 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H1/GalNAc-H2} = 3.7$  Hz,

GalNAc-H1), 4.82 – 4.76 (m, 1H, Sia-H4) 4.55 (td, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H1}} = 3.6$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H3}} = 10.5$  Hz, GalNAc-H2), 4.46 (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-CH2/Fmoc-H9}} = 6.9$  Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.35 – 4.15 (m, 4H, Fmoc-H9, Sia-H9a, Thr-H2, Thr-H3), 4.09 – 4.00 (m, 3H, Sia-9b, Sia-H5, Sia-H6) 3.97 – 3.91 (m, 1H, GalNAc-H5), 3.80 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H6a/GalNAc-H5}} = 7.4$  Hz  $^2J_{\text{GalNAc-H6b/GalNAc-H6a}} = 10.4$  Hz, GalNAc-H6a), 3.12 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H6b/GalNAc-H5}} = 4.3$  Hz,  $^2J_{\text{GalNAc-H6b/GalNAc-H6a}} = 10.4$  Hz, GalNAc-H6b), 2.55 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Sia-H3äq/Sia-H4}} = 4.6$  Hz,  $^2J_{\text{Sia-H3äq/Sia-H3ax}} = 12.7$  Hz, Sia-H3äq), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.09 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>-Ac), 2.01 – 2.00 (m, 7H, 2 CH<sub>3</sub>-Ac, Sia-H3ax), 1.99 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>-Ac), 1.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.44 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 1.29 (d, 3H,  $^3J_{\text{Thr-H4/Thr-H3}} = 6.3$  Hz, Thr-H4) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, HSQC, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),<sup>[302]</sup>  $\delta$  = 171.3, 171.0, 170.9, 170.7, 170.5, 170.4, 170.3, 170.2, 169.8 (C=O-Ac, C=O-AcNH, Thr-C1), 167.5 (Sia-C1), 156.7 (C=O, Urethan), 144.0, 143.8 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.4 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 134.8 (Bn-C<sup>q</sup>), 129.2, 129.0, 128.8, 127.9, 127.3, 127.2 (5 x Bn-C, Fmoc-C3, Fmoc-C6, Fmoc-C2, Fmoc-C7), 125.2 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 120.2, 120.1 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 100.2 (GalNAc-C1), 98.7 (Sia-C2), 83.2 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 77.4 (Thr-C3), 72.7 (Sia-C6), 69.0 (GalNAc-C3, Sia-C4), 68.6 (GalNAc-C5), 68.2 (Sia-C7), 68.0 (Bn-CH<sub>2</sub>), 67.7 (GalNAc-C4), 67.4 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 67.2 (Sia-C8), 64.0 (GalNAc-C6), 62.5 (Sia-C9), 59.3 (Thr-C2), 49.3 (Sia-C5), 47.4 (GalNAc-C2), 47.3 (Fmoc-C9), 37.8 (Sia-C3), 28.2 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 23.4, 23.3, 21.2, 21.1, 21.0, 20.8, 20.8 (CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH, ein CH<sub>3</sub>-AcSignal fehlt durch Überlagerung), 18.7 (Thr-C4) ppm.

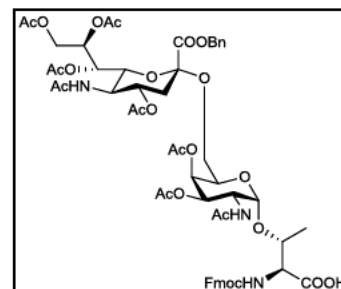
Weitere analytische Daten siehe Literatur. <sup>[158, 166, 302-303]</sup>



**5.4.12 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin (22a)**<sup>[158, 166]</sup>

Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NAcNeuCOOBn(2→6) $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH

Eine Lösung von 830 mg (0.672 mmol) Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NAcNeuCOOBn(2→6) $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-*O*tBu **22** wurde in 15 mL TFA und 1.5 mL H<sub>2</sub>O 3 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde mehrmals mit Toluol kodestilliert. Ausbeute: 680 mg (0.577 mmol, 86%) eines hellbraunen amorphen Feststoffs. Das Produkt wurde roh weiter eingesetzt.



C<sub>57</sub>H<sub>67</sub>N<sub>3</sub>O<sub>24</sub>, M = 1178.15  $\frac{g}{mol}$ , [1177.4115]

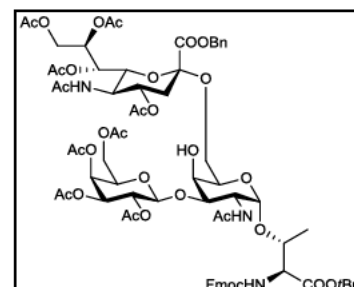
R<sub>f</sub> (EtOAc:MeOH = 2:1) = 0.24.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[158, 166, 302]</sup>

**5.4.13 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*.-butylester (25)**<sup>[208]</sup>

Fmoc-Thr( $\beta$ Ac<sub>4</sub>Gal(1→3)[ $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NAcNeuCOOBn(2→6) $\alpha$ GalNAc])-*O*tBu

Methylsulphenylbromidlösung 1.6 M in 1,2-Dichlorethan: Es wurden 410  $\mu$ L (8.00 mmol) Brom zu einer Lösung aus 709  $\mu$ L (8.00 mmol) Dimethylsulfid in 10 mL absolutem 1,2-Dichlorethan getropft. Die Lösung wurde 18 h unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt. Es wurden 460 mg (0.494 mmol, 1.0 Äq.) freies T-Antigen **24a** und 995 mg (1.48 mmol, 3.0 Äq.) Sialinsäuredonor **11** in 20 mL



absolutem Acetonitril und 10 mL absolutem Dichlormethan über 2.5 g ausgeheiztem Molsieb (4 Å) 1 h vorgerührt, bevor 380 mg (1.51 mmol, 3.0 Äq.) trockenes Silbertriflat zugegeben wurden. Die Suspension wurde auf -45 °C gekühlt und es wurden 0.93 mL (1.5 mmol, 3.0 Äq.) der auf 0 °C gekühlten Methylsulphenylbromidlösung zugetropft. Nach

einer Reaktionszeit von 6 h bei dieser Temperatur wurde die Reaktionsmischung mit DIPEA neutralisiert und mit 100 mL Dichlormethan verdünnt. Die Lösung wurde durch Hyflo® filtriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (EtOAc). Ausbeute: 624 mg (0.421 mmol, 86%) eines blassgelben Öls.

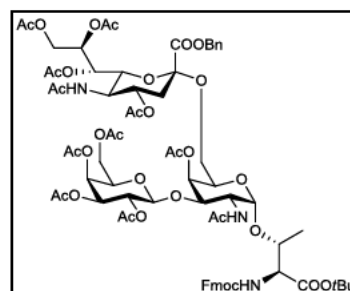
$C_{71}H_{89}N_3O_{31}$ ,  $M = 1480.47 \frac{g}{mol}$ , [1479.5480].

$R_f$  (EtOAc) = 0.23.

**5.4.14 *N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert.*-butylester (25a)<sup>[166]</sup>**

Fmoc-Thr(βAc<sub>4</sub>Gal(1→3)[αAc<sub>4</sub>NAcNeuCOOBn(2→6)αAcGalNAc])-*Obu*

Zu einer Lösung von 10 mL Pyridin und 5 mL Essigsäureanhydrid wurden 624 mg (0.421 mmol, 1.0 Äq.) des sT-Antigens **25** in Gegenwart von DMAP (5 mg, 40 μmol) gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 48 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde mehrmals mit Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (EtOAc). Ausbeute 460 mg (0.302 mmol, 72%) blassgelben amorphen Feststoffs.



$C_{73}H_{91}N_3O_{32}$ ,  $M = 1522.47 \frac{g}{mol}$ , [1521.5586].

$R_f$  (EtOAc) = 0.30.

ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $C_{73}H_{92}N_3O_{32}^+$ ,  $[M+H]^+$ , ber. 1522.5658, gef. 1522.5665.

$^1H$ -NMR (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  = 7.76 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H4/Fmoc-H3} = ^3J_{Fmoc-H5/Fmoc-H6} = 7.5$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.64 – 7.48 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.45 – 7.27 (m, 9H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7, 5 Bn-H), 5.95 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-NH/GalNAc-H2} = 9.7$  Hz, GalNAc-NH), 5.56 (d, 1H,  $^3J_{Thr-NH/Thr-H2} = 9.3$  Hz, Thr-NH), 5.39 – 5.33 (m, 1H, Gal-H4), 5.33 – 5.11 (m, 5H, Sia-H7, Sia-H8, GalNAc-H4, Bn-CH<sub>2</sub>), 5.10 – 5.02 (m, 1H, Gal-H2), 4.92 (dd, 1H,  $^3J_{Gal-H3/Gal-H4} = 3.0$  Hz,  $^3J_{Gal-H3/Gal-H2} = 10.6$  Hz, Gal-H3), 4.84 – 4.79 (m, 1H, Sia-H4), 4.77 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H1/GalNAc-H2} = 3.0$  Hz, GalNAc-

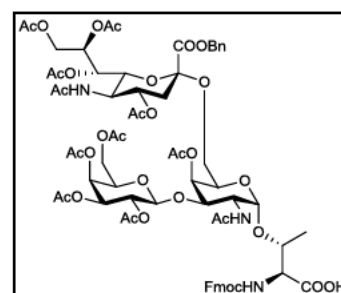
H1), 4.59 – 4.46 (m, 4H, GalNAc-H2, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Gal-H1), 4.29 – 4.21 (m, 2H, Sia-H9a, Fmoc-H9), 4.18 – 4.10 (m, 4H, Thr-H2, Thr-H3, Gal-H6a,b), 4.06 – 3.98 (m, 3H, Sia-H5, Sia-H6, Sia-H9b), 3.93 – 3.80 (m, 2H, GalNAc-H5, Gal-H5), 3.79 – 3.69 (m, 2H, GalNAc-H6a, GalNAc-H3), 3.30 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H6b/GalNAc-H5}} = 3.4 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{GalNAc-H6b/GalNAc-H6a}} = 10.5 \text{ Hz}$ , GalNAc-H6b), 2.56 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Sia-H3äq/Sia-H4}} = 4.5 \text{ Hz}$ ,  $^2J_{\text{Sia-H3äq/Sia-H3ax}} = 12.6 \text{ Hz}$ ), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.14 – 1.84 (m, 34H, CH<sub>3</sub>-Ac, Sia-H3ax), 1.44 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, HSQC, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 71.3, 170.8, 170.6, 170.5, 170.5, 170.4, 170.3, 170.3, 170.3, 170.2, 170.20, 169.8, 169.6, 168.3, 167.3 (C=O-Ac, -C=O-AcNH, Thr-C1), 165.6 (Sia-C1), 156.6 (C=O, Urethan), 143.8 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.4, 141.4 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 134.9 (Bn-C<sup>q</sup>), 128.9, 128.7, 128.6, 128.6, 128.6, 128.3 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C6, Fmoc-C7, Bn-C), 127.9 (Fmoc-C2, Fmoc-C7), 127.2 (Bn-C), 124.9 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 120.2 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 100.8 (Gal-C1), 100.2 (GalNAc-C1), 98.7, 97.7 (Sia-C2), 83.2 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 76.7 (Thr-C3), 73.2 (GalNAc-C3), 72.9 (Sia-C6), 71.3 (Gal-C2), 70.9 (Gal-C3), 70.6 (Gal-C5), 69.4 (GalNAc-C5), 69.1 (Sia-C4), 68.8 (Sia-C7), 68.7 (Sia-C8), 68.0, 67.9 (Bn-CH<sub>2</sub>), 67.4, (GalNAc-C4), 66.8 (Gal-C4, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 64.3 (GalNAc-C6), 62.5 (Sia-C9), 60.9 (Gal-C6), 59.4 (Thr-C2), 49.2 (Sia-C5), 48.6 (GalNAc-C2), 47.3 (Fmoc-C9), 37.5 (Sia-C3), 28.2 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 23.5, 23.2, 21.1, 21.1, 20.9, 20.9, 20.9, 20.9, 20.9, 20.8, 20.8, 20.8, 20.7, 20.7 (CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH), 18.8 (Thr-C4) ppm.

#### 5.4.15 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosyl]-L-threonin (25b)

Fmoc-Thr( $\beta$ Ac<sub>4</sub>Gal(1 $\rightarrow$ 3)[ $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NacNeuCOOBn(2 $\rightarrow$ 6) $\alpha$ AcGalNAc])-OH

Eine Lösung von 616 mg (0.405 mmol) Fmoc-Thr( $\beta$ Ac<sub>4</sub>Gal(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NacNeuCOOBn(2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ AcGalNAc])-*O**t*Bu **25a** wurde in 10 mL TFA und 1 mL H<sub>2</sub>O 2.5 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde mehrmals mit Toluol kodestilliert. Ausbeute: 473 mg (0.323 mmol, 80%) eines hellbraunen amorphen Feststoffs. Das Produkt wurde roh umgesetzt.



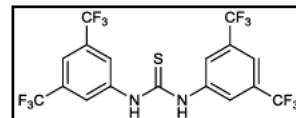
C<sub>69</sub>H<sub>83</sub>N<sub>3</sub>O<sub>32</sub>, 1466.40  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [1465.4960]

ESI-Messung ohne Erfolg.

## Alternative Glycosylierungsmethoden

### 5.4.16 *N,N'*-Bis[3,5-bis(trifluormethyl)phenyl]thioharnstoff (26)<sup>[213-214, 304]</sup>

In einem ausgeheizten 1 L-Kolben wurden 13.0 mL (87.0 mmol, 2.3 Äq.) 3,5-Di(trifluormethyl)anilin und 16.9 mL (12.3 g, 122 mmol, 2.8 Äq.) Triethylamin in 700 mL abs. THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 5.00 g (43.5 mmol, 1.0 Äq.) Thiophosgen in 70 mL abs. THF zugetropft. Die entstandene gelbe Suspension wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Der Rückstand wurde in 450 mL Wasser aufgenommen und zweimal mit je 150 mL Diethylether extrahiert. Die dunkelbraune organische Phase wurde einmal mit 100 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Der braune Rückstand wurde zunächst aus Chloroform umkristallisiert und es wurden hellbraune nadelförmige Kristalle erhalten. Letztere wurde in wenig Diethylether gelöst und durch Zugabe von Cyclohexan erneut als farblos amorpher Feststoff ausgefällt. Ausbeute: 10.5 g (21.0 mmol, 48%) eines farblos amorphen Feststoffs.



$\text{C}_{17}\text{H}_8\text{F}_{12}\text{N}_2\text{S}$ ,  $M = 500.30 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [500.0217].

$R_f(\text{cHex}:\text{EtOAc} = 2:1) = 0.92$ .

Smb.<sup>[214]</sup>: 160 - 161.5 °C.

HR-ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):<sup>[305]</sup>  $\text{C}_{17}\text{H}_9\text{F}_{12}\text{N}_2\text{S}^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber. 501.0295, gef. 501.0288.

HR-ESI-MS (negativ,  $m/z$ ):<sup>[306]</sup>  $\text{C}_{17}\text{H}_7\text{F}_{12}\text{N}_2\text{S}^-$ ,  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , ber. 499.0144, gef. 499.0147.

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),<sup>[213]</sup>  $\delta = 8.22 - 8.18$  (m, 4H, *o*-CH), 7.72 - 7.68 (m, 2H, *p*-CH) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),<sup>[213]</sup>  $\delta = 182.5$  (C=S), 142.6 (C-N), 132.9 (q,  $^2J_{\text{Cq/F}} = 33.4$  Hz,  $\text{C}^{\text{q}}\text{-CF}_3$ ) 124.8 (m, 2 x *o*-CH), 124.7 (q,  $^1J_{\text{C/F}} = 272.7$  Hz, -CF<sub>3</sub>), 118.9 (sept.,  $^3J_{\text{p-C/F}} = 3.8$  Hz, *p*-CH) ppm.

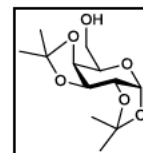


$^{19}\text{F}$ -NMR (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $^{[213]}\delta = -64.6$  (s,  $-\text{CF}_3$ ) ppm.

#### 5.4.17 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactose (27)<sup>[307]</sup>

iso<sub>2</sub>Gal

Zu einer Suspension von 88.6 g (550 mmol, 2.5 Äq.) wasserfreiem Kupfersulfat in 700 mL Aceton p.a. und 39.6 g (220 mmol, 1.0 Äq.) D-Galactose (**1**) wurden 5.30 mL konz. Schwefelsäure gegeben. Die Suspension wurde 24 h lang bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Kupfersulfat abfiltriert und das Filtrat mit festem Calciumhydroxid neutralisiert wurde. Die Suspension wurde erneut filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Produkts erfolgte an Kieselgel (cHex:EtOAc = 2:1). Ausbeute 25.0 g (98.3 mmol, 45%) eines gelben Öls.



$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$ ,  $M = 260.28 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [260.1260].

$R_f$  (cHex:EtOAc = 2:1) = 0.44.

$^1\text{H}$ -NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $^{[308]}\delta = 5.46$  (d, 1H,  $^3J_{\text{Gal-H1/Gal-H2}} = 5.0$  Hz, Gal-H1), 4.52 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Gal-H3/Gal-H2}} = 2.4$  Hz,  $^3J_{\text{Gal-H3/Gal-H4}} = 7.9$  Hz, Gal-H3), 4.24 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Gal-H2/Gal-H3}} = 2.4$  Hz,  $^3J_{\text{Gal-H2/Gal-H1}} = 5.0$  Hz, Gal-H2), 4.19 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Gal-H4/Gal-H5}} = 1.6$  Hz,  $^3J_{\text{Gal-H4/Gal-H3}} = 7.9$  Hz, Gal-H4), 3.86 – 3.51 (m, 3H, Gal-H5, Gal-H6a,b), 2.70 (bs, 1H, OH), 1.44 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1.36 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1.25 (s, 6H, 2 x  $-\text{CH}_3$ ) ppm

Für weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[308]</sup>

#### 5.4.18 Kupplung von 1:2,3:4-Diisopropylgalactose 27 an Sialinsäureglycal 14a<sup>[213]</sup>

Es wurden 140 mg (0.538 mmol, 1.0 Äq.) 1:2,3:4-Diisopropylgalactose **27** und 300 mg (0.635 mmol, 1.18 Äq.) Sialinsäureglycal **14a**, das aus den Reaktionen zu den Produkten **21** und **25** isoliert wurde, in 0.6 mL einer Lösung von Thioharnstoff **26** (12.5 mg in 3.0 mL,  $\sim 8.3$  mM) in absolutem Dichlormethan gelöst und in der Discovery erhitzt ( $p = 5$  bar,  $T_{\text{max}}$  und  $P_{\text{max}}$  variabel). Es konnte kein Edukteummsatz beobachtet werden.

### 5.4.19 *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff<sup>[309]</sup>

**Achtung! *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff ist cancerogen und zersetzt sich leicht in der Wärme und bei Bestrahlung. Stets tiefgekühlt und unter Lichtausschluss aufbewahren. Verschlussene Gefäße können unter Druck stehen!**

#### Variante A:

Eine Lösung von 4.1 g (61 mmol, 1.0 Äq.) Methylaminhydrochlorid und 12.1 g (200 mmol, 3.3 Äq.) Harnstoff in 25 mL destilliertem Wasser wurde 3 h lang unter Rückfluss erhitzt. In der noch warmen Lösung wurden 4.56 g (66.1 mmol, 1.1 Äq.) Natriumnitrit gelöst, bevor das Reaktionsgemisch auf -10 °C abgekühlt wurde. Die kalte Lösung wurde vorsichtig und unter intensivem Rühren bei -15 °C in eine Mischung von 24 g Eis und 4.4 g konz. Schwefelsäure eingetragen. Der *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff schied sich als farbloser bis blassgelber Feststoff ab. Das Produkt wurde abgesaugt und wurde unter Lichtausschluss im Gefrierfach aufbewahrt. Ausbeute: 6.2 g (61 mmol, quant.) Ausbeute eines blass gelben amorphen Feststoffs.

#### Variante B:

Analog Variante A, allerdings wurde der *N*-Methylharnstoff käuflich erworben.

Ausbeute: 95-98 %

### 5.4.20 Herstellung einer etherischen Diazomethanlösung

**Achtung! Diazomethan ist leicht flüchtig und als cancerogen einzustufen. Diazomethan ist sowohl in Lösung als auch als Reinsubstanz explosiv. Raue Oberflächen, starker Lichteinfall, Heizquellen sowie Alkalimetalle sind in unmittelbarer Umgebung zu vermeiden!**

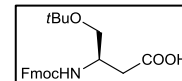
Es wurden 10 Äquivalente *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff in Bezug auf die Säure zu einer 50%-igen Lösung von KOH in Wasser gegeben, die mit Diethylether überschichtet war. Die organische Phase wurde dekantiert und so häufig mit neuem Ether ersetzt, bis sie nicht mehr gelb gefärbt war. Die organischen Phasen wurden vereint und mit wenig festem KOH bei -25 °C drei Stunden getrocknet.



### 5.4.21 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-4-(*O*-*tert*.-butyl)-L- $\beta^3$ -homo-serin<sup>[125, 310]</sup> (30a)

Fmoc-hSer(*O**t*Bu)-OH

Eine Lösung von 1.5 g (3.9 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-Ser(*O**t*Bu)-OH **30** wurde in 5.0 mL absolutem THF gelöst und auf -15 °C gekühlt. Die Lösung wurde mit 0.43 mL (3.9 mmol, 1.0 Äq.) *N*-Methylmorpholin und mit 0.51 mL (3.9 mmol, 1.0 Äq.) Chlorameisensäure-*iso*-butylester versetzt. Die Lösung wurde 15 min gerührt, bevor eine Lösung von Diazomethan in Ether (10 Äq. *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff bezogen auf die Säure) bei 0 °C hinzugegeben wurde. Die Lösung wurde 14 h gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Überschüssiges Diazomethan wurde mit verdünnter Essigsäure vernichtet. Die organischen Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit je 25 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-, einmal mit 25 mL gesättigter Ammoniumchlorid- und einmal mit 25 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 4.6 mL eines THF/Wasser-Gemischs (v/v = 9:1) aufgenommen und mit einer Lösung von 92 mg (0.42 mmol, 0.1 Äq.) Silbertrifluoracetat in 970  $\mu$ L *N*-Methylmorpholin (8.82 mmol, 2.3 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 16 h unter Lichtausschluss gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Das THF wurde im Vakuum entfernt und die wässrige Lösung wurde mit gesättigter 50 mL Natriumhydrogencarbonatlösung verdünnt. Nach Zugabe von 100 mL Diethylether wurde die organische Phase fünfmal mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase wurde unter Eiskühlung auf pH 2 angesäuert, bevor die resultierende Suspension fünfmal mit je 50 mL Ether extrahiert wurde. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 1.1 g (2.7 mmol, 70%) eines hellbraunen amorphen Feststoffs.



$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ ,  $M = 397.46 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [397.1889].

ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{Na}^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 420.18, gef. 420.16.

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta = 7.82$  (d,  $^3J_{\text{Fmoc-H4/Fmoc-H3}} = ^3J_{\text{Fmoc-H5/Fmoc-H6}} = 7.4$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5, 7.68 (d 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H1/Fmoc-H2}} = ^3J_{\text{Fmoc-H8/Fmoc-H7}} = 7.2$  Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8, 7.45 – 7.29 (m, 4H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7), 4.36 (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-CH2/Fmoc-H9}} = 6.9$  Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.23 (t, 1h,  $^3J_{\text{Fmoc-H9/Fmoc-CH2}} = 6.8$  Hz, Fmoc-H9, 4.13 – 4.05 (m, 1H, hSer-H3), 3.50 – 3.35 (m, 2H, hSer-H4a,b), 2.65 (dd, 1H,  $^3J_{\text{hSer-2a/hSer-3}}$ ).

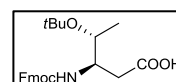
$H_3 = 6.0$  Hz,  $^3J_{\text{hSer-H2a/hSer-H2b}} = 16.0$  Hz, hSer-H2a), 2.49 (dd,  $^3J_{\text{hSer-2b/hSer-H3}} = 7.7$  Hz,  $^3J_{\text{hSer-H2b/hSer-H2a}} = 15.8$  Hz, hSer-H2b), 1.21 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ -*t*Bu) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[310]</sup>

#### 5.4.22 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-4-(*O*-*tert*.-butyl)-L- $\beta^3$ -homo-threonin<sup>[310]</sup> (31a)

Fmoc-hThr(*Ot*Bu)-OH

Eine Lösung von 2.0 g (5.0 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-Thr(*Ot*Bu)-OH **31** wurde in 1.0 mL absolutem THF gelöst und auf  $-15$  °C gekühlt. Die Lösung wurde mit 0.6 mL (5 mmol, 1.0 Äq.) *N*-Methylmorpholin und mit 0.7 mL (5 mmol, 1.0 Äq.) Chlorameisensäure-*iso*-butylester versetzt. Die Lösung wurde 15 min gerührt, bevor eine Lösung von Diazomethan in Ether (10 Äq. *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff bezogen auf die Säure) bei  $0$  °C hinzugegeben wurde. Die Lösung wurde 14 h gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Überschüssiges Diazomethan wurde mit verdünnter Essigsäure vernichtet. Die organischen Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit je 25 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-, einmal mit 25 mL gesättigter Ammoniumchlorid- und einmal mit 25 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 4.6 mL eines THF/Wasser-Gemischs ( $v/v = 9:1$ ) aufgenommen und mit einer Lösung von 115 mg (0.52 mmol, 0.1 Äq.) Silbertrifluoracetat in 1.2 mL *N*-Methylmorpholin (11 mmol, 2.3 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 16 h unter Lichtausschluss gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Das THF wurde im Vakuum entfernt und die wässrige Lösung wurde mit gesättigter 50 mL Natriumhydrogencarbonatlösung verdünnt. Nach Zugabe von 100 mL Diethylether wurde die organische Phase fünfmal mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase wurde unter Eiskühlung auf pH 2 angesäuert, bevor die resultierende Suspension fünfmal mit je 50 mL Ether extrahiert wurde. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 1.4 g (3.3 mmol, 69%) eines hellbraunen amorphen Feststoffs.



$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_5$ ,  $M = 411.49 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [411.2046].

ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_5\text{Na}^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 434.19, gef. 434.17.

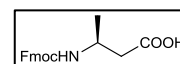
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$  = 7.80 (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H4/Fmoc-H3}} = ^3J_{\text{Fmoc-H5/Fmoc-H6}} = 7.4$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.68 (2 x d 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H1/Fmoc-H2}} = ^3J_{\text{Fmoc-H8/Fmoc-H7}} = 7.2$  Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.46 – 7.29 (m, 4H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7), 4.41 – 4.35 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.22 (t, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-H9/Fmoc-CH}_2} = 6.8$  Hz, Fmoc-H9), 4.09 – 4.03 (m 1H, hThr-H3), 3.88 – 3.78 (m, 1H, hThr-H4), 2.66 (dd, 1H,  $^3J_{\text{hThr-2a/hThr-H3}} = 5.0$  Hz,  $^3J_{\text{hThr-H2a/hThr-H2b}} = 15.9$  Hz, hThr-H2a), 2.39 (dd,  $^3J_{\text{hThr-2b/hThr-H3}} = 9.3$  Hz,  $^3J_{\text{hThr-H2b/hThr-H2a}} = 15.9$  Hz, hThr-H2b), 1.23 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ -*t*Bu), 1.06 (d, 3H,  $^3J_{\text{hThr-H5/hThr-H4}} = 6.5$  Hz, hThr-H5) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[310]</sup>

#### 5.4.23 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L- $\beta^3$ -homo-alanin<sup>[310]</sup> (96)

Fmoc-hAla-OH

Eine Lösung von 1.0 g (1.3 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-L-Ala-OH wurde in 1.0 mL absolutem THF gelöst und auf -15 °C gekühlt. Die Lösung wurde mit 0.13 mL (1.3 mmol, 1.0 Äq.) *N*-Methylmorpholin und mit 0.16 mL (1.3 mmol, 1.0 Äq.) Chlorameisensäure-*iso*-butylester versetzt. Die Lösung wurde 15 min gerührt, bevor eine Lösung von Diazomethan in Ether (10 Äq. *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff bezogen auf die Säure) bei 0 °C hinzugegeben wurde. Die Lösung wurde 14 h gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Überschüssiges Diazomethan wurde mit verdünnter Essigsäure vernichtet. Die organischen Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit je 25 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-, einmal mit 25 mL gesättigter Ammoniumchlorid- und einmal mit 25 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 4.6 mL eines THF/Wasser-Gemischs ( $v/v = 9:1$ ) aufgenommen und mit einer Lösung von 28.8 mg (0.131 mmol, 0.1 Äq.) Silbertrifluoracetat in 300  $\mu\text{L}$  *N*-Methylmorpholin (2.73 mmol, 2.3 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 16 h unter Lichtausschluss gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Das THF wurde im Vakuum entfernt und die wässrige Lösung wurde mit gesättigter 50 mL Natriumhydrogencarbonatlösung verdünnt. Nach Zugabe von 100 mL Diethylether wurde die organische Phase fünfmal mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase wurde unter Eiskühlung auf pH 2 angesäuert, bevor die resultierende Suspension fünfmal mit je 50 mL Ether extrahiert wurde. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im



Vakuum entfernt. Ausbeute: 0.31 g (0.75 mmol, 64%) eines hellbraunen amorphen Feststoffs.

$C_{19}H_{19}NO_4$ ,  $M = 325.36 \frac{g}{mol}$ , [325.1314].

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $C_{19}H_{20}NO_4^+$ ,  $[M+H]^+$ , ber. 326.1387, gef. 326.1387.

HR-ESI-MS (negativ, m/z):  $C_{19}H_{18}NO_4^+$ ,  $[M-H]^-$ , ber. 324.1241, gef. 324.1241.

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ ),  $\delta = 7.76$  (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H4/Fmoc-H3} = ^3J_{Fmoc-H5/Fmoc-H6} = 7.7$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.66 – 7.58 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.39 – 7.33 (m, 2H, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.31 – 7.25 (m, 2H, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 4.39 – 4.23 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.16 (t, 1H,  $^3J_{Fmoc-H9/Fmoc-CH_2} = 6.8$  Hz, Fmoc-H9), 4.07 – 3.96 (m, 1H, hAla-H3), 2.53 2.62 (dd, 1H,  $^3J_{hAla-H2a/hAla-H3} = 6.6$  Hz,  $^2J_{hAla-H2a/hAla-H2b} = 15.6$  Hz, hAla-H2a), 2.38 (dd, 1H,  $^3J_{hAla-H2b/hAla-H3} = 7.2$  Hz,  $^2J_{hAla-H2b/hAla-H2a} = 15.6$  Hz, hAla-H2b), 1.18. (d, 3H,  $^3J_{hAla-H4/hAla-H3} = 6.8$  Hz) ppm.

$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ ),  $\delta = 174.9$  (hAla-C1), 157.9 (C=O, Urethan, 145.3, 145.3 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 142.6 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 128.7, 128.7 (Fmoc-C2, Fmoc-C7), 128.1, 128.1 (Fmoc-C3, Fmoc-C6), 126.2, 126.1 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 67.6 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 48.4 (hAla-C3), 45.4 (Fmoc-C9), 41.8 (hAla-C2), 20.7 (hAla-C4) ppm.

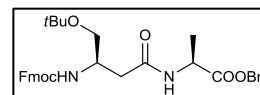
Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[310]</sup>

#### 5.4.24 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-4-(*O*-*tert*.-butyl)-L-β<sup>3</sup>-homo-seryl-L-alanin-benzylester (36)

(Fmoc-hSer(*O**t*Bu)-Ala-OBn)

Methode A:

Eine Lösung von 150 mg (0.377 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-hSer(*O**t*Bu)-OH **30a**, 123 mg (0.570 mmol, 1.5 Äq.) H-Ala-OBn Hydrochlorid, 215 mg (0.567 mmol, 1.5 Äq.) HBTU und 87 mg (0.568 mmol, 1.5 Äq.) HOBt in 10 mL wurde mit 0.19 mL (1.1 mmol, 2.9 Äq.) DIPEA versetzt und in der Mikrowelle 20 min erwärmt (50 °C, 100 W,  $p_{max} = 5$  bar). Die Lösung mit 10 mL Wasser verdünnt und dreimal gegen Diethylether extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereint, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute 145 mg (0.26 mmol, 70%) eines farblos amorphen Feststoffs.



## Methode B:

Eine Lösung von 150 mg (0.377 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-hSer(O $t$ Bu)-OH **30a**, 123 mg (0.570 mmol, 1.5 Äq.) H-Ala-OBn Hydrochlorid, 215 mg (0.567 mmol, 1.5 Äq.) HBTU und 87 mg (0.568 mmol, 1.5 Äq.) HOBt in 10 mL wurde mit 0.19 mL (1.1 mmol, 2.9 Äq.) DIPEA versetzt und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung mit 10 mL Wasser verdünnt und dreimal gegen Diethylether extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereint, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute 176 mg (0.315 mmol, 85%) eines farblos amorphen Feststoffs.

$C_{33}H_{38}N_2O_6$ ,  $M = 558.66 \frac{g}{mol}$ , [558.2730].

$R_f$ (cHex:EtOAc = 1:1) = 0.48.

ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $C_{33}H_{39}N_2O_6^+$ ,  $[M+H]^+$ , ber. 559.28, gef. 559.38.

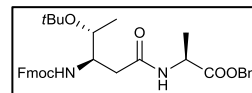
$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  = 7.76 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H4/Fmoc-H3} = ^3J_{Fmoc-H5/Fmoc-H6} = 7.5$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.65 – 7.58 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.44 – 7.27 (m, 9H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7), 6.67 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 5.77 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 5.23 – 5.10 (m, 2H, Bn-CH $_2$ ), 4.64 (p, 1H,  $^3J_{Ala-H2/Ala-H3} = 7.2$  Hz, Ala-H2), 4.36 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-CH2/Fmoc-H9} = 7.0$  Hz, Fmoc-CH $_2$ ), 4.23 (t, 1H,  $^3J_{Fmoc-H9/Fmoc-CH2} = 7.1$  Hz, Fmoc-H9), 4.16 – 4.09 (m, 1H, hSer-H3), 3.53 – 3.36 (m, 2H, hSer-H4a,b), 2.63 (dd, 1H,  $^3J_{hSer-H2a/hSer-H3} = 5.3$  Hz,  $^2J_{hSer-H2a/hSer-H2b} = 14.6$  Hz, hSer-H2a), 2.55 (dd, 1H,  $^3J_{hSer-H2b/hSer-H3} = 6.2$  Hz,  $^2J_{hSer-H2b/hSer-H2a} = 14.6$  Hz, hSer-H2b), 1.41 (d, 3H,  $^3J_{Ala-H3/Ala-H2} = 7.2$  Hz, Ala-H3), 1.18 (s, 9H, CH $_3$ - $t$ Bu) ppm.

$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  = 172.8 (Ala-C1), 170.5 (hSer-C1), 156.1 (C=O, Urethan), 144.0, 144.0 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 141.3 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 135.3 (Bn-C $^q$ ), 128.6, 128.4, 128.2, 127.7, 127.1 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C6, Fmoc-C7, Bn-C), 125.2 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 120.0 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 73.4 (C $^q$ - $t$ Bu), 67.2 (Bn-CH $_2$ ), 66.9 (Fmoc-CH $_2$ ), 62.8 (hSer-C4), 48.5 (hSer-C3), 48.1 (Ala-C2), 47.2 (Fmoc-C9), 38.0 (hSer-C2), 27.5 (CH $_3$ - $t$ Bu), 18.2 (Ala-C3) ppm.

### 5.4.25 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-4-(*O*-*tert*.-butyl)-*L*-β<sup>3</sup>-homo-threonyl-*L*-alanin-benzylester (37)

(Fmoc-hThr(*O**t*Bu)-Ala-OBn)

Zu einer Lösung von 150 mg (0.364 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-hThr(*O**t*Bu)-OH **31a**, 119 mg H-Ala-OBn Hydrochlorid (0.552 mmol, 1.5 Äq.), 209 mg (0.550 mmol, 1.5 Äq.) HBTU, 74 mg



(0.483 mmol, 1.3 Äq.) HOBt in 3 mL DMF wurden 200 µL (1.08 mmol, 3.0 Äq.) DIPEA gegeben. Die Lösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor sie mit 10 mL Wasser verdünnt wurde. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 10 mL Diethylether ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereint, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Die Reinigung erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (cHex: EtOAc = 1:1). Ausbeute: 158 mg (0.276 mmol, 77%) eines farblos amorphen Feststoffs.

$C_{34}H_{40}N_2O_6$ ,  $M = 572.69 \frac{g}{mol}$ , [572.2886].

$R_f$  (cHex:EtOAc = 1:1) = 0.55.

ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $C_{68}H_{80}N_4O_{12}Na^+$ ,  $[2M+Na]^+$ , ber. 1167.56, gef. 1167.57.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 7.76 (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H4/Fmoc-H3}} = ^3J_{\text{Fmoc-H5/Fmoc-H6}} = 7.5$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.60 (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H1/Fmoc-H2}} = ^3J_{\text{Fmoc-H8/Fmoc-H7}} = 7.0$  Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.43 – 7.28 (m, 9H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7), 6.60 (d, 1H,  $^3J_{\text{Ala-NH/Ala-H2}} = 6.6$  Hz, Ala-NH), 5.52 (d, 1H,  $^3J_{\text{hThr-NH/hThr-H3}} = 8.7$  Hz, hThr-NH), 5.21 – 5.07 (m, 2H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.62 (p, 1H,  $^3J_{\text{Ala-H2/Ala-H3}} = 7.1$  Hz, Ala-H2), 4.44 – 4.32 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.23 (t, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-H9/Fmoc-CH2}} = 7.0$  Hz, Fmoc-H9), 3.99 – 3.89 (m, 1H, hThr-H3), 3.89 – 3.79 (m, 1H, hThr-H4), 2.52 – 2.48 (m, 2H, hThr-H2a,b), 1.36 (d, 3H,  $^3J_{\text{Ala-H3/Ala-H2}} = 7.1$  Hz, Ala-H3), 1.20 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 1.12 (d, 3H,  $^3J_{\text{hThr-H5/hThr-H4}} = 5.9$  Hz, hThr-H5) ppm.

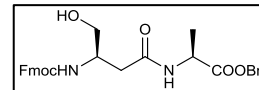
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 172.9 (Ala-C1), 170.7 (hThr-C1), 156.8 (C=O, Urethan), 144.1, 144.0 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.4 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 135.5 (Bn-C<sup>q</sup>), 128.7, 128.5, 128.2, 127.8, 127.2, 125.3, 120.1 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C5, Fmoc-C6, Bn-C), 74.1 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 67.8 (hThr-H4), 67.2 (Bn-CH<sub>2</sub>), 67.0 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 53.8 (hThr-H3), 48.2 (Ala-H2), 47.4 (Fmoc-H9), 38.7 (hThr-C2), 28.9 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 20.0 (hThr-C5), 18.3 (Ala-C3) ppm.



### 5.4.26 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L- $\beta^3$ -homo-seryl-L-alanin-benzylester<sup>[215]</sup> (38)

(Fmoc-hSer-Ala-OBn)

Zu einer Lösung von 2.0 g (3.6 mmol, 1.0 Äq) Fmoc-hSer(O*t*Bu)-Ala-OBn **36** in 50 mL absolutem Dichlormethan wurden unter Eiskühlung 0.59 mL TiCl<sub>4</sub> (5.4 mmol, 1.5 Äq.) gegeben. Die



Lösung wurde 5 min gerührt und auf Eiswasser gegossen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde ein weiteres Mal mit 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 1.42 g (2.83 mmol, 79%) eines hellbraunen amorphen Feststoffs.

C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, M = 502.55  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [502.2104].

R<sub>f</sub> (cHex:EtOAc = 1:2) = 0.17.

HR-ESI-MS (positiv, m/z): C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup>, ber. 525.2002, gef. 525.2026.

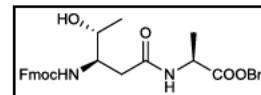
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$  = 8.32 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Ala-NH/Ala-H2</sub> = 6.9 Hz, Ala-NH), 7.88 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H4/Fmoc-H3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H5/Fmoc-H6</sub> = 7.4 Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.72 – 7.68 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H2), 7.49 – 7.23 (m, 9H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7), 7.09 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>hSer-NH/hSer-H3</sub> = 8.3 Hz, hSer-NH), 5.10 (s, 2H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.38 – 4.16 (m, 4H, Ala-H2, Fmoc-H9, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 3.86 (dt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>hSer-H3/hSer-H2,ab</sub> = 6.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>hSer-H3/hSer-H4,ab</sub> = 13.0 Hz, hSer-H3), 3.42 – 3.30 (m, 2H, hSer-H4a,b), 2.43 (dd, <sup>3</sup>J<sub>hSer-H2a/hSer-H3</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>hSer-H2a/hSer-H2b</sub> = 14.7 Hz, hSer-2a), 2.28 (dd, <sup>3</sup>J<sub>hSer-H2a/hSer-H3</sub> = 6.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>hSer-H2a/hSer-H2b</sub> = 14.7 Hz, hSer-2b), 1.28 (d, 3H, <sup>3</sup>J<sub>Ala-H3/Ala-H2</sub> = 7.2 Hz, Ala-H3) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  172.5 (Ala-C1), 170.2 (hSer-C1), 155.6 (C=O, Urethan), 144.0, 143.9 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.4 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 136.1 (Bn-C<sup>q</sup>), 128.9, 128.4, 128.0, 127.7, 127.7, 127.6, 127.3, 127.1 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C5, Fmoc-C6, Bn-C), 125.3, 125.3 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 120.1, 120.0 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 109.8, 65.8 (Bn-CH<sub>2</sub>), 65.4 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 62.7 (hSer-C4), 50.3 (hSer-H3), 47.7 (Ala-C2), 46.8 (Fmoc-C9), 37.0 (hSer-C2), 16.9 (Ala-C3) ppm.

### 5.4.27 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*- $\beta^3$ -homo-threonyl-*L*-alanin-benzylester<sup>[215]</sup> (39)

(Fmoc-hThr-Ala-OBn)

Zu einer Lösung von 158 mg (0.276 mmol, 1.0 Äq) Fmoc-hThr(O*t*Bu)-Ala-OBn **37** in 5 mL absolutem Dichlormethan wurden unter Eiskühlung 5  $\mu$ L TiCl<sub>4</sub> (0.4 mmol, 1.5 Äq.) gegeben.



Die Lösung wurde 5 min gerührt und auf Eiswasser gegossen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde ein weiteres Mal mit 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 120 mg (0.232 mmol, 83%) eines hellbraunen amorphen Feststoffs.

C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, M = 516.58  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [516.2260].

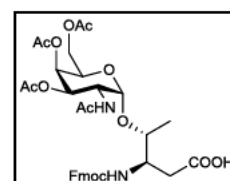
R<sub>f</sub> (cHex:EtOAc = 1:2) = 0.21.

HR-ESI-MS (positiv, m/z): C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup>, ber. 517.2333, gef. 517.2377.

### 5.4.28 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-*L*- $\beta^3$ -homo-threonin (19c)<sup>[123, 125]</sup>

Fmoc-hThr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH

Eine Lösung von 2.64 g (3.94 mmol, 1.0 Äq.) der Säure **19a** in 10 mL absolutem THF wurden auf -20 °C gekühlt und mit 472  $\mu$ L (4.29 mmol, 1.1 Äq.) *N*-Methylmorpholin und 562  $\mu$ L (4.29 mmol, 1.1 Äq.) Chlorameisensäure-*iso*-butylester versetzt. Die Lösung wurde 30 min bei dieser Temperatur gerührt, bevor eine Lösung von



Diazomethan in Ether (10 Äq. *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff bezogen auf die Säure) bei 0 °C hinzugegeben wurde. Die Lösung wurde 16 h gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Überschüssiges Diazomethan wurde mit verdünnter Essigsäure vernichtet. Die organischen Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 100 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit je 25 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-, einmal mit 25 mL gesättigter Ammoniumchlorid- und einmal mit 25 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 20 mL eines THF/Wasser-Gemischs (v/v = 9:1)

aufgenommen und mit einer Lösung von 71.6 mg (0.429 mmol, 0.1 Äq.) Silberacetat in 986  $\mu$ L *N*-Methylmorpholin (8.97 mmol, 2.3 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 16 h unter Lichtausschluss gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Das THF wurde im Vakuum entfernt und die wässrige Lösung wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung verdünnt. Nach Zugabe von 100 mL Diethylether wurde die organische Phase fünfmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase wurde unter Eiskühlung auf pH 2 angesäuert, bevor die resultierende Suspension fünfmal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert wurde. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 1.8 g (2.6 mmol, 66%) eines hellbraunen amorphen Feststoffs.

$$\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{13}, M = 684.69 \frac{\text{g}}{\text{mol}}, [684.2530]$$

HR-ESI-MS(positiv, m/z):<sup>[125]</sup>  $\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_{13}^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber. 685.2603, gef. 685.2588.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC, CD<sub>3</sub>OD),<sup>[125]</sup>  $\delta$  = 7.79 (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H4/Fmoc-H3}} = ^3J_{\text{Fmoc-H5/Fmoc-H6}} = 7.7$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.69 – 7.58 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.42 – 7.35 (m, 2H, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.31 (2 t, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H2/Fmoc-H3}} = ^3J_{\text{Fmoc-H2/Fmoc-H1}} = ^3J_{\text{Fmoc-H7/Fmoc-H6}} = ^3J_{\text{Fmoc-H7/Fmoc-H8}} = 7.4$  Hz, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 5.43 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H4/GalNAc-H3}} = 2.5$  Hz, GalNAc-H4), 5.09 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H4}} = 3.2$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H2}} = 11.7$  Hz, GalNAc-H3), 4.97 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1/GalNAc-H2}} = 3.7$  Hz, GalNAc-H1), 4.55 (dd,  $^3J_{\text{GalNAc-H6a/GalNAc-H5}} = 6.3$  Hz,  $^2J_{\text{GalNAc-H6a/GalNAc-H6b}} = 10.7$  Hz, GalNAc-H6a), 4.45 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H1}} = 3.7$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H3}} = 11.7$  Hz, GalNAc-H2), 4.41 (dd, 1H, dd,  $^3J_{\text{GalNAc-H6b/GalNAc-H5}} = 6.3$  Hz,  $^2J_{\text{GalNAc-H6b/GalNAc-H6a}} = 10.7$  Hz, GalNAc-H6b), 4.29 (t, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H5/GalNAc-H6}} = 6.4$  Hz, GalNAc-H5), 4.20 (t, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-H9/Fmoc-CH}_2} = 6.0$  Hz, Fmoc-H9), 4.16 – 4.05 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, hThr-H3), 3.91 – 3.72 (m, 1H, hThr-H4), 2.62 (dd, 1H,  $^3J_{\text{hThr-H2a/hThr-H3}} = 6.2$  Hz,  $^2J_{\text{hThr-H2a/hThr-H2b}} = 15.6$  Hz, hThr-H2a), 2.44 (dd, 1H,  $^3J_{\text{hThr-H2b/hThr-H3}} = 8.4$  Hz,  $^2J_{\text{hThr-H2b/hThr-H2a}} = 15.6$  Hz, hThr-H2b), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.00 (bs, 6H, 2 CH<sub>3</sub>-Ac), 1.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.16 (d, 3H,  $^3J_{\text{hThr-H5/hThr-H4}} = 6.4$  Hz, hThr-H5) ppm.

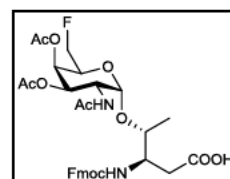
<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, HSQC, HMBC, CD<sub>3</sub>OD),<sup>[125]</sup>  $\delta$  = 174.6, 173.4, 172.9, 172.1, 172.1, 172.0 (3 x Ac-C=O, AcHN-C=O, hThr-C1), 158.3 (C=O, Urethan), 145.4, 145.2 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 142.7, 142.7 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 128.8, 128.7 (Fmoc-C2, Fmoc-C7), 128.2, 128.1 (Fmoc-C3, Fmoc-C6), 126.1, 126.0 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 121.0, 120.9 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 100.4 (GalNAc-C1), 78.6 (hThr-C4), 69.6 (GalNAc-C3), 68.8 (GalNAc-C4), 68.1 (GalNAc-C5), 67.3 (GalNAc-C6), 63.2 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 53.6 (hThr-C3), 49.1 (GalNAc-C2), 48.7 (Fmoc-C9), 36.8 (hThr-C2), 20.9, 20.7, 20.6, 20.5 (3 CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH), 18.2 (hThr-C5) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[125]</sup>

#### 5.4.29 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-fluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L- $\beta^3$ -homothreonin (29b)<sup>[123, 125]</sup>

Fmoc-hThr( $\alpha$ Ac<sub>2</sub>6FGalNAc)-OH

Eine Lösung von 900 mg (1.49 mmol, 1.0 Äq.) der Säure<sup>g</sup> **29** in 10 mL abs. THF wurden auf -20 °C gekühlt und mit 180  $\mu$ L (1.64 mmol, 1.1 Äq.) *N*-Methylmorpholin und 212  $\mu$ L (1.64 mmol, 1.1 Äq.) Chlorameisensäure-*iso*-butylester versetzt. Die Lösung wurde 30 min bei dieser Temperatur gerührt, bevor eine Lösung von Diazomethan in Ether (10 Äq. *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff bezogen auf die Säure) bei 0 °C hinzugegeben wurde. Die Lösung wurde 16 h gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Überschüssiges Diazomethan wurde mit verdünnter Essigsäure vernichtet. Die organischen Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit je 15 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-, einmal mit 15 mL gesättigter Ammoniumchlorid- und einmal mit 15 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 20 mL eines THF/Wasser-Gemischs ( $v/v = 9:1$ ) aufgenommen und mit einer Lösung von 25 mg (0.15 mmol, 0.1 Äq.) Silberacetat in 377  $\mu$ L (3.43 mmol, 2.3 Äq.) *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Lösung wurde 16 h unter Lichtausschluss gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Das THF wurde im Vakuum entfernt und die wässrige Lösung wurde mit 15 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung verdünnt. Nach der Zugabe von 50 mL Diethylether wurde die organische Phase fünfmal mit je 15 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase wurde unter Eiskühlung auf pH 2 angesäuert, bevor die resultierende Suspension fünfmal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert wurde. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 615 mg (0.954 mmol, 64%) eines hellbraunen amorphen Feststoffs.



$C_{32}H_{37}FN_2O_{11}$ ,  $M = 644.64 \frac{g}{mol}$ , [644.2381].

<sup>g</sup> Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>2</sub>6FGalNAc)-OH **29** wurde freundlicherweise von Markus Daum zur Verfügung gestellt.

$[a]_D^{20}$  (c = 1.00,  $\text{CHCl}_3$ ) = + 51.2.

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{FN}_2\text{O}_{11}^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber. 645.2454, gef. 645.2448.

HR-ESI-MS (negativ, m/z):  $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{FN}_2\text{O}_{11}^-$ ,  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , ber. 643.2307, gef. 643.2307.

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$  = 7.79 (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H4/Fmoc-H3}}$  =  $^3J_{\text{Fmoc-H5/Fmoc-H6}}$  = 7.4 Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.65 – 7.61 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.37 (t, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H3/Fmoc-H2}}$  =  $^3J_{\text{Fmoc-H3/Fmoc-H4}}$  =  $^3J_{\text{Fmoc-H6/Fmoc-H5}}$  =  $^3J_{\text{Fmoc-H6/Fmoc-H7}}$  = 7.3 Hz, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.30 (2 t, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H2/Fmoc-H3}}$  =  $^3J_{\text{Fmoc-H2/Fmoc-H1}}$  =  $^3J_{\text{Fmoc-H7/Fmoc-H6}}$  =  $^3J_{\text{Fmoc-H7/Fmoc-H8}}$  = 7.4 Hz, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 5.50 – 5.39 (dd, 1H,  $J$  = 2.7 Hz,  $J$  = 16.3 Hz, GalNAc-H4), 5.09 (dt,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H4}}$  = 3.7 Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H2}}$  = 11.7 Hz, GalNAc-H3), 4.98 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1/GalNAc-H2}}$  = 3.7 Hz,  $J_{\text{GalNAc-H1/GalNAc-F}}$  = 10.0 Hz, GalNAc-H1), 4.55 (2 dd, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-CH2a/Fmoc-H9}}$  = 6.3 Hz,  $^2J_{\text{Fmoc-CH2a/Fmoc-CH2b}}$  = 10.7 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>a), 4.50 – 4.24 (m, 5H, GalNAc-H6a, GalNAc-H2, Fmoc-CH<sub>2</sub>b, GalNAc-H6b, GalNAc-H5), 4.24 – 4.15 (m, 1H, Fmoc-H9), 4.15 – 4.00 (m, 2H, hThr-H3), 3.84 – 3.77 (m, 1H, hThr-H4), 2.66 – 2.57 (m, 1H, hThr-H2a), 2.44 (dd, 1H,  $^3J_{\text{hThr-H2b/hThr-H3}}$  = 8.4 Hz,  $^3J_{\text{hThr-H2b/hThr-H3}}$  = 15.5 Hz, hThr-H2b), 2.15 – 2.12 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.01 – 1.93 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.18 – 1.14 (m, 2H, hThr-H5), 0.92 (d, 1H,  $^3J_{\text{hThr-H5/hThr-H4}}$  = 6.7 Hz, hThr-H5) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$  = 174.6, 174.6, 173.5, 173.4, 173.4, 172.1, 172.1, 172.0, 172.0, 171.9, 171.9 (2 x Ac-C=O, AcHN-C=O, hThr-C1), 158.3 (C=O, Urethan), 145.4, 145.4, 145.2, 145.1, (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 142.7, 142.7, 142.6 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 128.7, 128.7, 128.2, 128.1 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C6, Fmoc-C7), 126.1, 126.0 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 121.0, 120.9, 120.9 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 100.4 (GalNAc-C1), 82.9 (d,  $^2J_{\text{GalNAc-C6/GalNAc-C6F}}$  = 169.4 Hz), 78.6 (hThr-C4), 69.6, 69.5 (GalNAc-C3), 69.1, 68.7 (GalNAc-C4), 68.1 (GalNAc-C5), 67.3, 67.2 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 53.6, 53.5 (hThr-C3), 49.1 (GalNAc-C2), 48.7, 48.7 (Fmoc-C9), 36.8, 36.7 (hThr-C2), 22.6, 20.7, 20.7, 20.6, 20.5, 20.5 (Ac-CH<sub>3</sub>, AcHN-CH<sub>3</sub>), 18.2, 18.1 (hThr-C5) ppm.

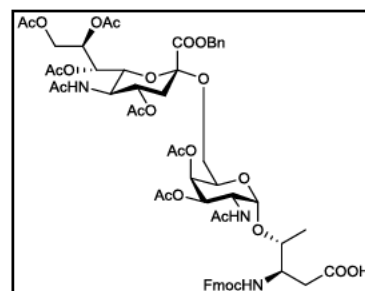
$^{19}\text{F}$ -NMR (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$  = -231.56 (dt,  $^2J_{\text{F/GalNAc-C5}}$  = 15.1 Hz,  $^1J_{\text{F/GalNAc-C6}}$  = 47.1 Hz), -232.68 (dt,  $^2J_{\text{F/GalNAc-C5}}$  = 14.9 Hz,  $^1J_{\text{F/GalNAc-C6}}$  = 46.6).

Zum Teil doppelter Signalsatz durch Rotamere.

**5.4.30 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,-di-*O*-acetyl-2-desoxy-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L- $\beta^3$ -homo-threonin<sup>[123, 125]</sup>**

Fmoc-hThr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NAcNeuCOOBn(2 $\rightarrow$ 6) $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH

Eine Lösung von 680 mg (0.570 mmol, 1.0 Äq.) der Säure **22a** in 5 mL abs. THF wurde auf -20 °C gekühlt und mit 68.9  $\mu$ L (0.627 mmol, 1.1 Äq.) *N*-Methylmorpholin und 81.3  $\mu$ L (0.627 mmol, 1.1 Äq.) Chlorameisen-säure-*iso*-butylester versetzt. Die Lösung wurde 30 min bei dieser Temperatur gerührt, bevor eine Lösung von Diazomethan in Ether (10 Äq. *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff bezogen auf die



Säure) bei 0 °C hinzugegeben wurde. Die Lösung wurde 16 h gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Überschüssiges Diazomethan wurde mit verdünnter Essigsäure vernichtet. Die organischen Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit je 15 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-, einmal mit 15 mL gesättigter Ammoniumchlorid- und einmal mit 15 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 20 mL eines THF/Wasser-Gemischs ( $v/v = 9:1$ ) aufgenommen und mit einer Lösung von 10.5 mg (62.9  $\mu$ mol, 0.1 Äq.) Silberacetat in 144  $\mu$ L (1.31 mmol, 2.3 Äq.) *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Lösung wurde 16 h unter Lichtausschluss gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Das THF wurde im Vakuum entfernt und die wässrige Lösung wurde mit 15 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung verdünnt. Nach der Zugabe von 50 mL Diethylether wurde die organische Phase fünfmal mit je 15 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase wurde unter Eiskühlung auf pH 2 angesäuert, bevor die resultierende Suspension fünfmal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert wurde. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 258 mg (0.216 mmol, 38%) eines hellbraunen amorphen Feststoffs.

$C_{58}H_{69}N_3O_{24}$ ,  $M = 1192.17 \frac{g}{mol}$ , [1191.4271].

$[\alpha]_D^{25}$  ( $c = 1.00$ , MeOH) = + 17.2.

HR-ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $C_{58}H_{69}N_3O_{24}Na^+$ ,  $[M+Na]^+$ , ber. 1214.4163, gef. 1214.4137.



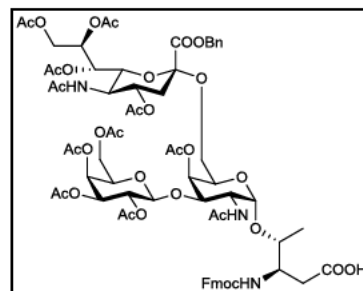
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta = 7.86 - 7.75$  (m, 2H, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.65 (d, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-H1/Fmoc-H2}} = 7.4$  Hz, Fmoc-H1), 7.64 (d, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-H8/Fmoc-H7}} = 7.4$  Hz, Fmoc-H8), 7.46 – 7.25 (m, 9H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7, 5 x Bn-H), 5.42 – 5.36 (m, 1H, Sia-H8), 5.35 – 5.28 (m, 2H, Sia-H7, Bn-CH<sub>2a</sub>), 5.25 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H4/GalNAc-H3}} = 2.7$  Hz, GalNAc-H4), 5.20 (d, 1H,  $^2J_{\text{Bn-CH2b/Bn-CH2a}} = 12.0$  Hz, Bn-CH<sub>2b</sub>), 4.98 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H4}} = 3.2$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H2}} = 11.6$  Hz, GalNAc-H3), 4.91 (GalNAc-H1, unter Methanol-Peak), 4.84 – 4.78 (m, 1H, Sia-H4), 4.65 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-CH2a/Fmoc-H9}} = 6.0$  Hz,  $^2J_{\text{Fmoc-CH2a/Fmoc-CH2b}} = 10.8$  Hz, Fmoc-CH<sub>2a</sub>), 4.45 – 4.35 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2b</sub>, GalNAc-H2), 4.27 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Sia-H9a/Sia-H8}} = 2.5$  Hz,  $^2J_{\text{Sia-H9a/Sia-H9b}} = 12.4$  Hz, Sia-H9a), 4.23 – 4.16 (m, 2H, Fmoc-H9, Sia-H6), 4.06 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Sia-H9b/Sia-H8}} = 5.9$  Hz,  $^2J_{\text{Sia-H9b/Sia-H9a}} = 12.4$  Hz, Sia-H9b), 4.06 – 3.94 (m, 3H, hThr-H3, GalNAc-H3, Sia-H5), 3.82 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H6a/GalNAc-H5}} = 7.1$  Hz,  $^2J_{\text{GalNAc-H6a/GalNAc-H6b}} = 10.9$  Hz, GalNAc-H6a), 3.76 (m, 1H, hThr-H4), 3.13 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H6b/GalNAc-H5}} = 4.8$  Hz,  $^2J_{\text{GalNAc-H6b/GalNAc-H6a}} = 10.2$  Hz, GalNAc-H6b), 2.65 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Sia-H3eq/Sia-H4}} = 4.6$  Hz,  $^2J_{\text{Sia-H3eq/Sia-H3ax}} = 13.0$  Hz, Sia-H3eq), 2.58 (dd, 1H,  $^3J_{\text{hThr-H2a/hThr-H3}} = 6.3$  Hz,  $^2J_{\text{hThr-H2a/hThr-H2b}} = 15.6$  Hz, hThr-H2a), 2.41 (dd, 1H,  $^3J_{\text{hThr-H2b/hThr-H3}} = 8.4$  Hz,  $^2J_{\text{hThr-H2b/hThr-H2a}} = 15.6$  Hz, hThr-H2b), 2.10 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 2.09 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 2.06 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 1.96 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 1.94 (s, 3H, AcHN-CH<sub>3</sub>), 1.83 (s, 3H, AcHN-CH<sub>3</sub>), 1.80 (d, 1H,  $^3J_{\text{Sia-H32ax/Sia-H4}} = 5.2$  Hz, Sia-H3ax), 1.10 (d, 3H,  $^3J_{\text{hThr-H5/hThr-H4}} = 6.3$  Hz, hThr-H5) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, HSQC, HMBC,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta = 174.6, 173.5, 173.4, 172.3, 172.2, 171.9, 171.7, 171.6, 171.4$  (6 x Ac-C=O, 2 x AcHN-C=O, hThr-C1), 168.6 (Sia-C1), 158.3 (C=O, Urethan), 145.5, 145.1 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 142.8 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 136.6 (Bn-C<sup>q</sup>), 129.9, 129.9, 129.8, 128.9, 128.7, 128.3, 128.2 (Fmoc-C3, Fmoc-C6, 4 x Bn-C), 126.1 (Fmoc-C2, Fmoc-C7), 125.9 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 121.1, 121.0 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 100.4 (GalNAc-C1), 99.9 (Sia-C2), 78.9 (hThr-C4), 73.4 (Sia-C6), 70.6 (Sia-C4), 69.7 (GalNAc-C3), 69.2 (GalNAc-C4), 69.0 (Sia-C8), 69.0 (Bn-CH<sub>2</sub>), 69.0 (GalNAc-C5), 68.5 (Sia-C7), 67.1 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 64.9 (GalNAc-C6), 63.5 (Sia-C9), 53.7 (hThr-C3), 50.0 (Sia-C5), 48.9 (GalNAc-C2), 48.7 (Fmoc-C9), 38.9 (Sia-C3), 36.9 (hThr-C2), 22.7, 22.6, 21.2, 20.9, 20.7 (CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH, Signale fehlen durch Überlagerung), 18.5 (hThr-C5) ppm.

**5.4.31 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L- $\beta^3$ -homo-threonin (25c)<sup>[123, 125]</sup>**

Fmoc-hThr( $\beta$ Ac<sub>4</sub>Gal(1 $\rightarrow$ 3)[ $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NAcNeuCOOBn(2 $\rightarrow$ 6) $\alpha$ AcGalNAc])-OH

Eine Lösung von 473 mg (0.322 mmol, 1.0 Äq.) der freien Säure **25b** in 5 mL abs. THF wurden auf -20 °C gekühlt und mit 39  $\mu$ L (0.355 mmol, 1.1 Äq.) *N*-Methylmorpholin und 45.4  $\mu$ L (0.355 mmol, 1.1 Äq.) Chlorameisensäure-*iso*-butylester versetzt. Die Lösung wurde 30 min bei dieser Temperatur gerührt, bevor eine Lösung von Diazomethan in Ether (10 Äq. *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff bezogen auf die freie Säure) bei 0 °C hinzugegeben wurde. Die Lösung wurde 16 h gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Überschüssiges Diazomethan wurde mit verdünnter Essigäure vernichtet. Die organischen Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit je 15 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-, einmal mit 15 mL gesättigter Ammoniumchlorid- und einmal mit 15 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 5 mL eines THF/Wasser-Gemischs (*v/v* = 9:1) aufgenommen und mit einer Lösung von 6.7 mg (40  $\mu$ mol, 0.1 Äq.) Silberacetat in 82  $\mu$ L (0.74 mmol, 2.3 Äq.) *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Lösung wurde 16 h unter Lichtausschluss gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Das THF wurde im Vakuum entfernt und die wässrige Lösung wurde mit 15 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung verdünnt. Nach der Zugabe von 50 mL Diethylether wurde die organische Phase fünfmal mit je 15 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase wurde unter Eiskühlung auf pH 2 angesäuert, bevor die resultierende Suspension fünfmal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert wurde. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 12 mg (8.1  $\mu$ mol, 3%) eines hellbraunen amorphen Feststoffs.



$C_{70}H_{85}N_3O_{32}$ ,  $M = 1480.42 \frac{g}{mol}$ , [1479.5116].

HR-ESI-MS (positiv, *m/z*):  $C_{70}H_{86}N_3O_{32}^+$ ,  $[M+H]^+$ , ber. 1480.5189, gef. 1480.5184,  $C_{70}H_{87}N_3O_{32}Na^+$ ,  $[M+Na]^+$ , ber. 1502.5008, gef. 1502.5011.

HR-ESI-MS (negativ, *m/z*):  $C_{70}H_{84}N_3O_{32}^-$ ,  $[M-H]^-$ , ber. 1478.5043, gef. 1478.5138.

$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$  = 7.80 (2 x d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H4/Fmoc-H3}} = 3J_{\text{Fmoc-H5/Fmoc-H6}} = 7.4$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.70 (d, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-H4/Fmoc-H3}} = 8.0$  Hz, Fmoc-H1 oder Fmoc-H8), 7.66 (d, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-H4/Fmoc-H3}} = 8.0$  Hz, Fmoc-H1 oder Fmoc-H8), 7.44 – 7.29 (m, 9H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7, 5 x Bn-H), 5.38 – 5.30 (m, 3H, Sia-H7, Sia-H8, Gal-H3), 5.30 – 5.23 (m, 3H, GalNAc-H4, Bn- $\text{CH}_2$ ), 5.01 – 4.95 (m, 2H, Gal-H2, GalNAc-H5), 4.87 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1/GalNAc-H2}} = 3.9$  Hz, GalNAc-H1), 4.81 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H, Sia-H4), 4.65 (d, 1H,  $^3J_{\text{Gal-H1/Gal-H2}} = 7.2$  Hz, Gal-H1), 4.51 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-CH2a/Fmoc-H9}} = 6.4$  Hz,  $^2J_{\text{Fmoc-CH2a/Fmoc-CH2b}} = 10.8$  Hz, Fmoc- $\text{CH}_2\text{a}$ ), 4.45 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-CH2b/Fmoc-H9}} = 6.3$  Hz,  $^2J_{\text{Fmoc-CH2b/Fmoc-CH2a}} = 10.8$  Hz, Fmoc- $\text{CH}_2\text{b}$ ), 4.37 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H1}} = 3.9$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H3}} = 11.1$  Hz, GalNAc-H2), 4.31 – 4.26 (m, 1H, Sia-H9a), 4.23 (t, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-H9/Fmoc-CH2}} = 6.3$  Hz, Fmoc-H9), 4.20 – 4.12 (m, 3H, Gal-H6a,b, Sia-H6), 4.08 – 4.03 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Sia-H9b/Sia-H8}} = 5.4$  Hz,  $^2J_{\text{Sia-H9b/Sia-H9a}} = 12.4$  Hz, Sia-H9b), 4.02 – 3.90 (m, 4H, hThr-H3, GalNAc-H5, GalNAc-H4, GalNAc-H2), 3.85 (dd,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H4}} = 3.3$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H2}} = 11.1$  Hz, GalNAc-H3), 3.82 (dd, 1H,  $^3J_{\text{hThr-H4/hThr-H3}} = 2.7$  Hz,  $^3J_{\text{hThr-H4/hThr-H5}} = 6.4$  Hz, hThr-H4), 3.79 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H6a,b/GalNAc-H5}} = 7.6$  Hz,  $^2J_{\text{GalNAc-H6a/GalNAc-H6b}} = 10.1$  Hz, GalNAc-H6a), 3.29 (m, 1H, GalNAc-H6b unter MeOH-Peak), 2.72 – 2.61 (m, 2H, Sia-H3äq, hThr-H2a), 2.50 (dd, 1H,  $^3J_{\text{hThr-H2b/hThr-H3}} = 8.4$  Hz,  $^2J_{\text{hThr-2a/hThr-2b}} = 15.6$  Hz, hThr-H2b), 2.14, 2.09, 2.09, 2.07, 2.01, 2.01, 1.99, 1.98, 1.93 (8 s, 30H, 9 x  $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ,  $\text{CH}_3\text{-AcNH}$ ), 1.85 – 1.80 (m, 4H,  $\text{CH}_3\text{-AcNH}$ , Sia-H3ax), 1.17 (d, 3H,  $^3J_{\text{hThr-H5/hThr-H4}} = 6.4$  Hz, hThr-H5) ppm.

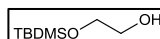
$^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz, HSQC, HMBC,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$  = 174.7, 173.5, 172.9, 172.4, 172.2, 172.1, 172.0, 171.9, 171.8, 171.5, 171.4, 171.1 ( $\text{C=O-Ac}$ ,  $\text{C=O-Ac}$ , hThr-C1), 168.6 (Sia-C1), 158.4 ( $\text{C=O}$ , Urethan), 145.4, 145.2 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 142.7 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 136.7 (Bn- $\text{C}^q$ ), 129.8, 129.7, 129.6, 128.9, 128.8, 128.3, 128.2 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C6, Fmoc-C7, 4 x Bn-C, Signale fehlen durch Überlagerung), 126.2, 126.1, 126.0 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 121.0 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 102.4 (Gal-C1), 100.5 (GalNAc-C1), 99.9 (Sia-C2), 78.5 (hThr-C4), 74.7 (GalNAc-C3), 73.4 (Sia-C6), 72.2 (Gal-C2), 71.7 (Gal-C5), 71.4 (GalNAc-C4), 70.7 (Sia-C4), 70.2 (GalNAc-C5), 70.0 (Gal-C4), 69.6 (Gal-C3), 68.9 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 68.7 (Sia-C8), 68.5 (Sia-C7), 67.4 (Fmoc- $\text{CH}_2$ ), 65.5 (GalNAc-C6), 63.5 (Sia-C9), 62.2 (Gal-C6), 53.7 (hThr-C3), 50.5 (GalNAc-C2), 50.0 (Sia-C5), 48.7 (Fmoc-C9), 38.8 (Sia-C3), 36.6 (hThr-C2), 23.0, 22.7, 21.2, 21.0, 20.9, 20.8, 20.7, 20.5, 19.5 ( $\text{CH}_3\text{-Ac-CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-AcNH}$ , Signale fehlen durch Überlagerung), 18.2 (hThr-C5) ppm.

## 5.5 Synthesen zu 4.4 – fluorierte $\beta^3$ -homo-Serinbausteine

### 5.5.1 2-(*Tert.*-butyldimethylsilyloxy)-ethanol (**46**)<sup>[311]</sup>

TBDMSO-EtOH

Zu einer Lösung von 10.0 g (161 mmol, 1.0 Äq.) Ethylenglycol in 600 mL Dichlormethan wurden 25.0 mL (180 mmol, 1.1 Äq.) Triethylamin gegeben und die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden portionsweise 29.1 g (193 mmol, 1.2 Äq.) TBDMS-Cl gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Die Reinigung des Produkts erfolgte durch an Kieselgel (cHex:EtOAc = 3:1). Ausbeute: 10.4 g (59.0 mmol, 37%) eines blassgelben Öls.



$\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_2\text{Si}$ ,  $M = 176.34 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [176.1233].

$R_f$  (cHex:EtOAc = 3:1) = 0.59.

ESI- und FD-Messungen lieferten keine Ergebnisse.

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[312]</sup>  $\delta$  = 3.69 – 3.66 (m, 2H), 3.61 – 3.59 (m, 2H), 2.33 (bs, 1H, OH), 0.88 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ -*t*Bu), 0.05 (s, 2 x 3H, 2 x - $\text{CH}_3$ ) ppm.

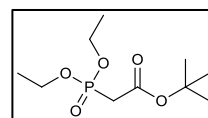
$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[312]</sup>  $\delta$  = 64.3, 63.8 (C1, C2), 26.0 ( $\text{CH}_3$ -*t*Bu), 18.4 ( $\text{C}^q$ -*t*Bu), -5.3 (2 x - $\text{CH}_3$ ) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[312]</sup>

### 5.5.2 2-(Di-Ethoxyphosphoryl)-essigsäure *tert.*-butylester (**44**)<sup>[231]</sup>

EtO<sub>2</sub>-PO-Ac-O*t*Bu

Es wurden 20.0 mL (116 mmol, 1.0 Äq.) Triethylphosphit und 16.8 mL (115 mmol, 1.0 Äq.) 2-Brom-essigsäure-*tert.*-butylester (**43**) 6 h lang auf 65 °C erwärmt. Ausbeute: 29.0 g (115 mmol, quant.), einer intensiv riechenden farblosen Flüssigkeit. Das Produkt wurde roh weiter eingesetzt.



$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{P}$ ,  $M = 252.24 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [252.1127].

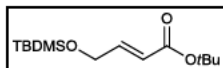
ESI- und FD-Messungen lieferten keine Ergebnisse.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[231]</sup>  $\delta$  = 4.07 (q, 2H,  $^3J_{\text{EtO-CH}_2/\text{EtO-CH}_3}$  = 7.1 Hz, EtO-CH<sub>2</sub>), 4.06 (q, 2H,  $^3J_{\text{EtO-CH}_2/\text{EtOCH}_3}$  = 7.1 Hz, EtO-CH<sub>2</sub>), 2.78 (d, 2H,  $^2J_{\text{Ac-CH}_2\text{a}/\text{Ac-CH}_2\text{b}}$  = 21.4 Hz, Ac-CH<sub>2</sub>), 1.37 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 1.25 (2 x t, 2 x 3H,  $^3J_{\text{EtO-CH}_3/\text{EtO-CH}_2}$  = 7.1 Hz, EtO-CH<sub>3</sub>) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  = 164.8, 164.7 (C=O, Rotamer), 81.8 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 62.3, 62.3 (2 x EtO-CH<sub>2</sub>), 36.4, 34.6 (Ac-CH<sub>2</sub>), 27.8 (*t*Bu-CH<sub>3</sub>), 16.3, 16.2 (2 x EtO-CH<sub>3</sub>,) ppm.

### 5.5.3 (*E*)-4-(*Tert.*-butyldimethylsilyloxy)-2-en-buttersäure-*tert.*-butylester (50)<sup>[218, 313-314]</sup>

TBDMSO- $\gamma$ HBA-O/*t*Bu

Zu einer auf -78 °C gekühlten Lösung von 3.22 mL (37.4 mmol, 1.1 Äq.) Oxalylchlorid in 20 mL abs. Dichlormethan wurden 5.13 mL  (72.2 mmol, 2.1 Äq.) DMSO in 40 mL abs. Dichlormethan getropft. Die Lösung wurde 10 min rühren gelassen, bevor eine Mischung aus 6.00 g (34.0 mmol, 1.0 Äq.) Alkohol **46** und 9.43 mL (68.0 mmol, 1.8 Äq.) Triethylamin in 40 mL absolutem Dichlormethan zugetropft wurden. Es wurde weitere 15 min bei dieser Temperatur gerührt, bevor 28.4 mL (170 mmol, 5.0 Äq.) Triethylamin zugetropft wurden. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h rühren gelassen, wobei es sich auf Raumtemperatur erwärmte. Es wurde so lange 1 M Salzsäure zugegeben, bis ein pH-Wert von 4 erreicht wurde. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde ein weiteres Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Aldehyd wurde ohne weitere Reinigungsschritte weiter umgesetzt.

Von dem erhaltenen Aldehyd **48** wurden 3.25 g (18.9 mmol, 1.0 Äq.) in 50 mL absolutem Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wurden 4.72 g Lithiumchlorid (111 mmol, 5.90 Äq.) und 5.06 g (19.8 mmol, 1.1 Äq.) Diethylphosphonoessigsäure *tert.*-butylester **44** gegeben. Nach der Zugabe von 2.40 mL (14.9 mmol, 0.8 Äq.) DIPEA wurde die Suspension 48 h gerührt, mit 50 mL Wasser verdünnt und schließlich fünfmal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (cHex:EtOAc = 20:1). Ausbeute: 3.34 g (12.1 mmol, 64%) eines farblosen Öls.

$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{Si}$ ,  $M = 272.46 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [272.1808].

$R_f(\text{cHex:EtOAc} = 10:1) = 0.84$ .

ESI- und FD-Messungen lieferten keine Ergebnisse.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )<sup>[218]</sup>,  $\delta = 6.86$  (dt, 1H,  $^3J_{\gamma\text{HBA-H3}/\gamma\text{HBA-H4a,b}} = 3.6$  Hz,  $^3J_{\gamma\text{HBA-H3}/\gamma\text{HBA-H2}} = 15.4$  Hz,  $\gamma\text{HBA-H3}$ ), 5.97 (dt, 1H,  $^4J_{\gamma\text{HBA-H2}/\gamma\text{HBA-H4}} = 2.2$  Hz,  $^3J_{\gamma\text{HBA-H2}/\gamma\text{HBA-H3}} = 15.4$  Hz,  $\gamma\text{HBA-H2}$ ), 4.29 (dd, 2H,  $^3J_{\gamma\text{HBA-H4}/\gamma\text{HBA-H2}} = 2.3$  Hz,  $^3J_{\gamma\text{HBA-H4}/\gamma\text{HBA-H3}} = 3.6$  Hz,  $\gamma\text{HBA-H4a,b}$ ), 1.46 (s, 9H,  $\text{CH}_3\text{-O}t\text{Bu}$ ), 0.89 (s, 9H,  $\text{CH}_3\text{-Si}t\text{Bu}$ ), 0.07 (s, 6H, 2 x  $-\text{CH}_3$ ) ppm.

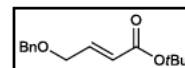
$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )<sup>[218]</sup>,  $\delta = 166.1$  ( $\gamma\text{HBA-C1}$ ), 146.1 ( $\gamma\text{HBA-C3}$ ), 121.6 ( $\gamma\text{HBA-C2}$ ), 80.2 ( $\text{C}^q\text{-O}t\text{Bu}$ ), 62.3 ( $\gamma\text{HBA-C4}$ ), 28.3, 27.0, 26.0 ( $\text{CH}_3\text{-O}t\text{Bu}$ ,  $\text{CH}_3\text{-Si}t\text{Bu}$ ), 18.4 ( $\text{C}^q\text{-Si}t\text{Bu}$ ), -5.3 (2 x  $\text{Si-CH}_3$ ) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[218]</sup>

#### 5.5.4 (*E*)-4-(Benzyloxy)-2-en-buttersäure-*tert*.-butylester (51)<sup>[218]</sup>

$\text{BnO-}\gamma\text{HBA-O}t\text{Bu}$

Zu einer auf  $-78^\circ\text{C}$  gekühlten Lösung von 3.11 mL (36.2 mmol, 1.1 Äq.) Oxalylchlorid in 20 mL abs. Dichlormethan wurden 4.95 mL (78.9 mmol, 2.4 Äq.) DMSO in 40 mL absolutem Dichlormethan getropft. Die Lösung wurde 10 min rühren gelassen, bevor eine Mischung aus 5.00 g (32.9 mmol, 1.0 Äq.) Alkohol **47** in 20 mL absolutem Dichlormethan zugetropft wurden. Es wurde weitere 15 min bei dieser Temperatur gerührt, bevor 27.5 mL (165 mmol, 5.0 Äq.) Triethylamin zugetropft wurden. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h rühren gelassen, wobei es sich auf Raumtemperatur erwärmte. Es wurde so lange 1 M Salzsäure zugegeben, bis ein pH-Wert von 4 erreicht wurde. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde ein weiteres Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Aldehyd wurde ohne weitere Reinigungsschritte weiter umgesetzt.



Von dem erhaltenen Aldehyd **49** wurden 4.94 g (32.9 mmol, 1.0 Äq.) in 50 mL absolutem Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wurden 4.72 g Lithiumchlorid (111 mmol, 3.4 Äq.) und 5.00 g (19.8 mmol, 0.6 Äq.) Diethylphosphonoessigsäure *tert*.-butylester **44** gegeben. Nach der Zugabe von 2.40 mL (14.9 mmol, 0.8 Äq.) DIPEA wurde die Suspension 48 h gerührt, mit 50 mL Wasser verdünnt und schließlich fünfmal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das



Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte an Kieselgel (cHex:EtOAc = 20:1). Ausbeute: 2.71 g (10.7 mmol, 54%) eines farblosen Öls.

$C_{15}H_{20}O_3$ ,  $M = 248.32 \frac{g}{mol}$ , [248.1412].

$R_f$  (cHex:EtOAc = 10:1) = 0.59.

ESI- und EI-Messungen lieferten keine Ergebnisse.

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),<sup>[218]</sup>  $\delta$  = 7.39 – 7.28 (m, 5H, Bn-H), 6.89 (dt, 1H,  $^3J_{\gamma HBA-H3/\gamma HBA-H4} = 4.5$  Hz,  $^3J_{\gamma HBA-H3/\gamma HBA-H2} = 15.7$  Hz,  $\gamma HBA-H3$ ), 6.05 (dt, 1H,  $^3J_{\gamma HBA-H2/\gamma HBA-H4a,b} = 2.0$  Hz,  $^3J_{\gamma HBA-H2/\gamma HBA-H3} = 15.7$  Hz,  $\gamma HBA-H2$ ), 4.56 (s, 2H, Bn- $CH_2$ ), 4.16 (dd, 2H,  $^3J_{\gamma HBA-H4a,b/\gamma HBA-H2} = 2.0$  Hz,  $^3J_{\gamma HBA-H4a,b/H3} = 4.5$  Hz,  $\gamma HBA-H4a,b$ ), 1.50 (s, 9H,  $CH_3-tBu$ ) ppm.

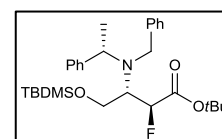
$^{13}C$ -NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )<sup>[218]</sup>,  $\delta$  = 165.7 ( $\gamma HBA-C1$ ), 143.0 ( $\gamma HBA-C3$ ), 137.9, 128.5, 127.9, 127.7 (5 x Bn-C), 123.4 ( $\gamma HBA-C2$ ), 80.4 ( $C^q-tBu$ ), 72.8 (Bn- $CH_2$ ), 68.8 ( $\gamma HBA-C4$ ), 28.2 ( $CH_3-tBu$ ) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[218]</sup>

### 5.5.5 (2S, 3S, $\alpha$ S)-4-(*Tert.*-Butyldimethylsilyloxy)-3-(*N*-benzyl- $\alpha$ -*N*-methylbenzyl-amino)-2-fluorbuttersäure-*tert.*-butylester (52)<sup>[233]</sup>

TBDMSO-3N-2F- $\gamma HBA-OtBu$

Es wurden 3.80 mL (18.3 mmol, 1.5 Äq.) (S)-(-)-*N*-Benzyl- $\alpha$ -methylbenzylamin in 50 mL absolutem THF gelöst und auf -78 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 11.6 mL (1.6 M in Hexan, 18.3 mmol, 1.5 Äq.) *n*BuLi getropft und die Reaktionsmischung



30 min lang gerührt. Zu der tief violetten Lösung wurden 3.30 g (12.1 mmol, 1.0 Äq.) des ungesättigten Esters **50** gelöst in 40 mL absolutem THF getropft. Nach 2.5 h bei -78 °C wurde die Reaktion zur Vervollständigung für 30 min auf -30 °C erwärmt, bevor sie wieder auf -50 °C gekühlt wurde und 5.81 g (18.3 mmol, 1.5 Äq.) NFSI, gelöst in 30 mL absolutem THF, zugegeben wurde. Die Lösung wurde weitere 30 min bei -50 °C gerührt, bevor die Reaktion mit 100 mL gesättigter Ammoniumchloridlösung beendet wurde. Die Lösung wurde mit 200 mL Ethylacetat verdünnt und die Phasen wurden getrennt. Die organische Phase wurde zunächst mit Wasser dann mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und schließlich mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im

Vakuum entfernt und das Produkt an Kieselgel ( $\text{CHCl}_3$ ) gereinigt. Ausbeute: 2.81 g (5.60 mmol, 46%) eines farblosen Öls (*anti*), dr: 3:97 (*syn:anti*).

$\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{FNO}_3\text{Si}$ ,  $M = 501.75 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [501.3074].

$R_f(\text{CHCl}_3) = 0.88$  (*syn*).

$R_f(\text{CHCl}_3) = 0.83$  (*anti*).

$[\alpha]_D^{20}$  ( $c=1.00$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) = + 18.0.

HR-ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{FNO}_3\text{Si}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$  ber. 502.3153, gef. 502.3146.

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta = 7.51 - 7.27$  (m, 10H, Bn-H), 4.58 (dd, 1H  $^3J_{\text{hSer-H2/hSer-H3}} = 1.7$  Hz,  $^2J_{\text{hSer-H2/hSer-F}} = 48.9$  Hz, hSer-H2), 4.12 (d, 1H,  $^2J_{\text{Bn-CH2a/BnCH-2b}} = 15.0$  Hz, Bn-CH<sub>2</sub>a), 4.04 (q, 1H,  $^3J_{\text{Bn-CHMe/Bn-CHMe}} = 6.9$  Hz, Bn-CHMe), 3.92 – 3.60 (m, 4H, Bn-CH<sub>2</sub>b, hSer-H4a,b, hSer-H3), 1.46 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-OtBu), 1.42 (d, 3H,  $^3J_{\text{Bn-CHMe/Bn-CHMe}} = 6.9$  Hz, Bn-CHMe), 0.97 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-Si*t*Bu), 0.11, 0.08 (2 x s, 6H, CH<sub>3</sub>-Si) ppm.

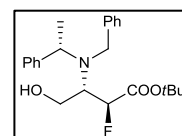
$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz, HSQC, HMBC,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta = 168.0$  (d,  $^3J_{\text{hSer-C1/F}} = 23.1$  Hz, hSer-C1), 143.0 (Bn-C<sup>q</sup>-CHMe), 141.7 (Bn-C<sup>q</sup>-CH<sub>2</sub>), 128.4, 128.3, 128.3, 128.1, 127.1, 126.7 (8x Bn-C), 90.4 (d  $^1J_{\text{hSer-C2/F}} = 188.5$  Hz, hSer-C2) 82.3 (C<sup>q</sup>-OtBu), 60.7 (d,  $^4J_{\text{hSer-C4/F}} = 6.7$  Hz, hSer-C4), 59.9 (d,  $^3J_{\text{hSer-C3/F}} = 18.4$  Hz, hSer-C3), 57.9 (Bn-CHMe), 51.3 (Bn-CH<sub>2</sub>), 28.2 (CH<sub>3</sub>-OtBu), 26.2 (CH<sub>3</sub>-Si*t*Bu), 18.80, 18.63 (Bn-CHMe, C<sup>q</sup>-Si*t*Bu), -5.29, -5.46 (2 x -CH<sub>3</sub>) ppm.

$^{19}\text{F}$ -NMR (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta = -201.3$  (dd,  $^3J_{\text{hSer-F/hSer-H3}} = 29.2$  Hz,  $^2J_{\text{hSer-F/hSer-H2}} = 48.9$  Hz) ppm.

### 5.5.6 (2S, 3S, $\alpha$ S)-3-(*N*-Benzyl- $\alpha$ -*N*-methylbenzyl-amino)-2-fluor-4-hydroxy-buttersäure-*tert*.-butylester <sup>[233]</sup>(55)

3N-2F- $\gamma$ HBA-O*t*Bu

Eine Lösung von 250 mg (0.498 mmol, 1.0 Äq.) TBDMS-Ether **52** in 5 mL abs. Tetrahydrofuran wurde mit 1.04 mL TBAF-Lösung (1 M in THF, 1.04 mmol, 2.1 Äq.) und 90.0  $\mu\text{L}$  Eisessig (1.56 mmol, 3.1 Äq.)



versetzt und bis zum vollständigen Umsatz auf 40 °C erwärmt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in 20 mL Diethylether aufgenommen. Die organische Phase wurde einmal mit 10 mL gesättigter

Natriumhydrogencarbonatlösung, zweimal mit je 10 mL Wasser und einmal mit 10 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde an Kieselgel gereinigt ( $\text{CHCl}_3$ ). Ausbeute: 150 mg (0.387 mmol, 78%) eines blassgelben Öls.

$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{FNO}_3$ , [387.49].

$R_f(\text{CHCl}_3) = 0.28$ .

$[\alpha]_D^{20}$  (c=1.00,  $\text{CHCl}_3$ ) = -3.2.

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{FNO}_3\text{Na}^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 410.2107, gef. 410.2108.

$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta = 7.50 - 7.22$  (m, 10H, 10 x Bn-H), 4.33 (d, 1H,  $^2J_{\text{hSer-H2/hSer-F}} = 49.7$  Hz, hSer-H2), 4.18 – 4.08 (m, 1H, Bn- $\text{CH}_2$ a), 4.02 (q, 1H,  $^3J_{\text{Bn-CHMe/Bn-CHMe}} = 7.1$  Hz, Bn-**CHMe**), 3.82 – 3.70 (m, 3H, hSer-H3, Bn- $\text{CH}_2$ b, hSer-H4a), 3.67 – 3.58 (m, 1H, hSer-H4b), 2.55 (bs, 1H, OH), 1.50 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ -*t*Bu), 1.35 (d, 3H,  $^3J_{\text{Bn-CHMe/BnCHMe}} = 6.9$  Hz, Bn-**CHMe**) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz, HSQC, HMBC,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta = 168.0, 167.9$  (hSer-C1), 140.8, 140.3, 128.7, 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 127.7, 127.2 (10 x Bn-C), 89.0 (d,  $^1J_{\text{hSer-F/hSer-C2}} = 189.3$  Hz, hSer-C2), 83.0 ( $\text{C}^q$ -*t*Bu), 59.1 (d,  $^3J_{\text{hSer-C3/hSer-F}} = 18.4$  Hz, hSer-C3), 57.9, 57.9 (d,  $4J_{2\text{FhSer-C4}/2\text{FhSer-F2}} = 7.3$  Hz, hSer-C4), 57.1 (Bn-**CH**-Me), 50.8 (Bn- $\text{CH}_2$ ), 28.0, 27.7 (*t*Bu- $\text{CH}_3$ ), 19.5 (Bn-**CHMe**).

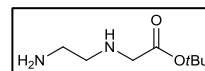
$^{19}\text{F}$ -NMR (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta = -200.3$  (dd,  $^3J_{\text{hSer-F/hSer-H3}} = 32.2$  Hz,  $^2J_{\text{hSer-F/hSer-H2}} = 49.5$  Hz) ppm.

## 5.6 Synthesen zu 4.5 – PNA-ähnliche Glycoverbindungen

### 5.6.1 *N*-(2-Aminoethyl)-glycin-*tert*.-butylester (69)<sup>[170-171]</sup>

NEt-Gly-*Ot*Bu

Zu einer Lösung von 75.0 mL (1.12 mol, 9.1 Äq.) Ethylendiamin **68** in 525 mL Dichlormethan wurden 18.8 mL (130 mmol, 1.0 Äq.) 2-Bromessigsäure-*tert*.-butylester (**43**) in 105 mL Dichlormethan innerhalb von 5 h getropft. Die farblose Suspension wurde 24 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde dreimal mit je 120 mL Wasser gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen wurden einmal mit 120 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 22.6 g (0.13 mol, quant.) an farblos Kristalle, die sich aus einem hellgelben Öl abscheiden.



$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ ,  $M = 174.24 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [174.1368].

$R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}) = 0.07$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[170-171]</sup>  $\delta = 3.27$  (s, 1H,  $\text{NH}_2\text{a}$ ), 3.15 (t,  $^3J_{\text{NH}/\text{H}_{3\text{a,b}}} = 5.4$  Hz, 1H, NH), 3.10 (s, 2H,  $\text{H}_{2\text{a,b}}$ ), 2.84 – 2.77 (m, 1H,  $\text{NH}_2\text{b}$ ), 2.65 – 2.57 (m, 2H,  $\text{H}_{4\text{a,b}}$ ), 2.54 – 2.44 (m, 2H,  $\text{H}_{3\text{a,b}}$ ), 1.28 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$ ), 1.06 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$ ) ppm.

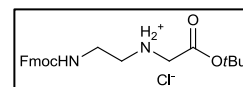
$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[170-171]</sup>  $\delta = 171.7$ , 170.1 ( $\text{C}_1$ , Konformere), 80.9 ( $\text{C}^q\text{-}t\text{Bu}$ ), 51.9 ( $\text{C}_2$ ), 51.3, 41.3 ( $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$ ), 31.1, 27.9 ( $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$ , Konformere) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[170]</sup>

### 5.6.2 *N*-((*N'*-(9*H*-Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-glycin *tert*.-butylester Hydrochlorid (**70**)<sup>[170-171]</sup>

Fmoc-NEt-Gly-*Ot*Bu \* HCl

Zu einer Lösung von 22.4 g (128 mmol, 1.0 Äq.) Amin **69** und 21.2 mL (123 mmol, 1.0 Äq.) DIPEA in 250 mL Dichlormethan wurden 41.6 g (123 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-Succinimid gelöst in 230 mL Dichlormethan innerhalb von 3 h bei Raumtemperatur zugetropft. Die Lösung wurde weitere 20 h gerührt, bevor die Mischung fünfmal mit je 120 mL 1 M Salzsäure und einmal mit 120 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen wurde. Die organische



Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Volumen auf ca. 150 mL eingengt. Das Produkt wurde über Nacht in der Gefriertruhe bei -20 °C zur Kristallisation gebracht, abgesaugt und mit kaltem Dichlormethan gewaschen. Ausbeute 24.8 g (57.3 mmol, 47%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

$C_{23}H_{29}ClN_2O_4$ ,  $M = 432.94 \frac{g}{mol}$ , [432.1816].

$R_f(cHex:EtOAc = 1:1) = 0.08$ .

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $^{[170-171]} C_{23}H_{29}N_2O_4^+$ ,  $[M-Cl]^+$ , ber. 397.2122, gef. 397.2117.

HR-ESI-MS (negativ, m/z):  $C_{23}H_{28}N_2O_4^-$ ,  $[M-H]^-$ , ber. 431.1743, gef. 431.1742.

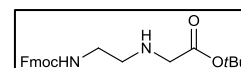
$^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $^{[170-171]} \delta = 9.44$  (s, 2H, H-NH $_2^+$ ), 7.89 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H4/Fmoc-H3} = ^3J_{Fmoc-H5/Fmoc-H6} = 7.5$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.69 (2 x d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H1/Fmoc-H2} = ^3J_{Fmoc-H8/Fmoc-H7} = 9.1$  Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.61 (t, 1H,  $^3J_{Fmoc-NH/Fmoc-H4a,b} = 5.6$  Hz, Fmoc-NH), 7.41 (t, 2H,  $^3J_{Fmoc-H3/Fmoc-H2} = ^3J_{Fmoc-H3/Fmoc-H4} = ^3J_{Fmoc-H6/Fmoc-H5} = ^3J_{Fmoc-H6/Fmoc-H7} = 7.2$  Hz, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.33 (2 x t, 2H,  $^3J_{Fmoc-H2/Fmoc-H3} = ^3J_{Fmoc-H2/Fmoc-H1} = ^3J_{Fmoc-H7/Fmoc-H6} = ^3J_{Fmoc-H7/Fmoc-H8} = 7.4$  Hz, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 4.32 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-CH2/Fmoc-H9} = 6.6$  Hz, Fmoc-CH $_2$ ), 4.22 (t, 1H,  $^3J = 6.8$  Hz, Fmoc-H9), 3.86 (s, 2H, H2a,b), 3.39 – 3.26 (m, 2H, H4a,b), 3.01 (t, 2H,  $^3J_{H3a,b/H4a,b} = 6.2$  Hz, H3a,b), 1.45 (s, 9H, CH $_3$ -*t*Bu) ppm.

$^{13}C$ -NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $^{[170-171]} \delta = 165.6$  (C1), 156.2 (C=O, Urethan), 143.8 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 140.7 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 127.6 (Fmoc-C3, Fmoc-C6), 127.0 (Fmoc-C2, Fmoc-C7), 125.1 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 120.1 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 82.9 (C $^q$ -*t*Bu), 65.6 (Fmoc-CH $_2$ ), 54.9 (C2), 47.2 (Fmoc-C9), 46.6, 46.4 (C3, C4), 27.6 (CH $_3$ -*t*Bu) ppm.

### 5.6.3 *N*-((*N'*-(9*H*-Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-glycin *tert.*-butylester (**70a**)<sup>[170-171]</sup>

Fmoc-NEt-Gly-*Ot*Bu

Eine Suspension von 24.6 g (61.4 mmol, 1.0 Äq) Hydrochlorid **70** in 1.1 L Dichlormethan wurde dreimal mit je 350 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt, mit CaCl $_2$  getrocknet und eingengt. Ausbeute: 19.6 g (49.5 mmol, 81%) eines blassgelben, amorphen Feststoffs.



$C_{23}H_{28}N_2O_4$ ,  $M = 396.48 \frac{g}{mol}$ , [396.2049].

$R_f(\text{EtOAc}) = 0.26$ .

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $^{[170-171]}$   $\delta = 7.81 - 7.56$  (m, 4H, Fmoc-H4, Fmoc-H5, Fmoc-H3, Fmoc-H6),  $7.45 - 7.26$  (m, 4H, Fmoc-H1, Fmoc-H2, Fmoc-H7, Fmoc-H8),  $5.46 - 5.32$  (m, 1H, Fmoc-NH),  $4.40$  (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-CH}_2/\text{Fmoc-H}_9} = 6.9$  Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>),  $4.22$  (t,  $^3J_{\text{Fmoc-H}_9/\text{Fmoc-CH}_2} = 6.9$  Hz, Fmoc-H<sub>9</sub>),  $3.34 - 3.21$  (m, 4H, H<sub>2a,b</sub>, H<sub>4a,b</sub>),  $2.85 - 2.62$  (m, 2H, H<sub>3a,b</sub>),  $1.64$  (s, 1H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu),  $1.46$  (s, 8H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

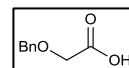
$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $^{[170-171]}$   $\delta = 171.9$  (C1),  $157.8$  (C=O, Urethan),  $142.3$  (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a),  $139.8$  (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a),  $129.3$  (Fmoc-C3, Fmoc-C6),  $127.0$  (Fmoc-C2, Fmoc-C7),  $121.8$  (Fmoc-C1, Fmoc-C8),  $120.4$  (Fmoc-C4, Fmoc-C5),  $80.0$  (C<sup>q</sup>-*t*Bu),  $54.9$  (Fmoc-CH<sub>2</sub>),  $51.3$ ,  $50.9$  (C3, C4),  $31.3$  (C2),  $27.7$  (CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[170]</sup>

#### 5.6.4 2-(Benzyloxy)-essigsäure (73) <sup>[315]</sup>

BnO-hAc-OH

Zu 90.0 mL (866 mmol, 6.7 Äq.) Benzylalkohol wurden 6.00 g Natrium (261 mmol, 2.0 Äq.) kleinen Portionen gegeben und die Mischung wurde erwärmt, bis sich das Natrium vollständig löste. Die farblose Reaktionslösung wurde 90 min refluxiert, bevor 12.2 g (129 mmol, 1.0 Äq.) 2-Chloressigsäure (**72**) in 25 mL Benzylalkohol zugetropft wurden. Die Reaktionsmischung wurde weitere 6 h refluxiert, abkühlen gelassen und 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 300 mL Wasser und 100 mL Ethylacetat verdünnt und der pH-Wert wurde mit ca. 60 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 40 mL 1 M Natriumhydroxidlösung auf 9-10 eingestellt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 50 mL Ether extrahiert und der pH-Wert wurde danach mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 eingestellt. Die resultierende Suspension wurde dreimal mit je 100 mL Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 14.2 g (85.5 mmol, 66%) eines farblosen Öls.



$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$ ,  $M = 166.17 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ,  $^{[166.0630]}$ .

$R_f(\text{cHex:EtOAc} = 1:1) = 0.21$ .

HR-ESI-MS (negativ,  $m/z$ ):  $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3^-$ ,  $^{[M-H]}^-$ , ber. 165.0557, gef. 165.0557.



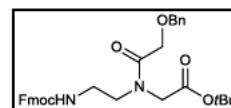
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[315]</sup>  $\delta$  = 10.04 (s, 1H, COOH), 7.40 – 7.30 (m, 5H, Bn-H), 4.65 (s, 2H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.15 (s, 2H, hAc-CH<sub>2</sub>) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[316]</sup>  $\delta$  = 175.5 (C1), 136.7, 128.6, 128.3, 128.2 (Bn-C), 73.5 (C2), 66.6 (Bn-CH<sub>2</sub>) ppm.

### 5.6.5 *N*-((*N'*-(9*H*-fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-(2-(benzyloxy)-acetamid)-glycin-*tert*.-butylester (74)

Fmoc-NEt-(BnO-hAc)-Gly-*Or*Bu

Zu einer Lösung von 112 mg (0.734 mmol, 1.2 Äq.) Carbonsäure **73**, 313 mg HATU (0.823 mmol, 1.3 Äq.), 112 mg HOAt (0.822 mmol, 1.3 Äq.) und 537  $\mu\text{L}$  DIPEA (3.08 mmol, 5.0 Äq) in 2.5 mL DMF wurde eine Suspension von 250 mg Amin **70a** (0.631 mmol, 1.0 Äq) in 3.5 mL DMF zugegetropft und 16 h bei RT gerührt. Nach vollständigem Umsatz des Eduktes wurden 5 mL Wasser hinzugegeben und die resultierende Suspension wurde fünfmal mit je 10 mL Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Produkts erfolgte Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (cHex:EtOAc = 1:1). Ausbeute: 105 mg (193  $\mu\text{mol}$ , 31%) eines farblosen Öls.



$\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6$ ,  $M = 544.64 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [544.2573].

$R_f(\text{cHex:EtOAc} = 1:1) = 0.32$ .

HR-ESI-MS (positiv,  $m/z$ ),  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_6^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber. 545.2646, gef. 545.2641.

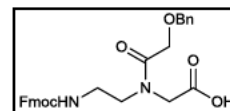
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  = 7.75 (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H4}/\text{Fmoc-H3}} = ^3J_{\text{Fmoc-H5}/\text{Fmoc-H6}} = 7.4$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.58 (2 x d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H1}/\text{Fmoc-H2}} = ^3J_{\text{Fmoc-H8}/\text{Fmoc-H7}} = 7.1$  Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.43 – 7.24 (m, 9H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7, 5 x Bn-H), 5.83, (t, 1H,  $^3J_{\text{NH}/\text{H4a,b}} = 5.2$  Hz, NH), 4.55 (s, 2H, Bn-CH<sub>2</sub>), 4.35 (t, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-CH2}/\text{Fmoc-H9}} = 6.2$  Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.14 (d, 2H,  $^2J_{\text{hAc-H2a}/\text{hAc-H2b}} = 27.5$  Hz, hAc-H2a,b), 3.98 (d, 2H,  $^2J_{\text{H2a}/\text{H2b}} = 36.3$  Hz, H2a,b), 3.53 (dt, 2H,  $^3J_{\text{H3a,b}/\text{H4a,b}} = 5.8$  Hz,  $^2J_{\text{H3a}/\text{H3b}} = 20.2$  Hz, H3a,b), 3.37 (dd, 2H,  $^3J_{\text{H4a,b}/\text{H3a,b}} = 5.8$  Hz,  $^2J_{\text{H4a}/\text{H4b}} = 20.2$  Hz, H4a,b), 1.49, 1.42 (2 x s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz, HSQC, HMBC,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  = 170.8, 170.0, 169.3, 168.8 (C1, C=O-N, Rotamere), 156.8, 156.7 (C=O, Urethan, Rotamere), 144.1, 144.0 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.5 141.4 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 137.2, 137.1 (Bn-C<sup>q</sup>, Rotamere), 128.7, 128.6 (Fmoc-C3, Fmoc-C6, Rotamere), 128.4, 128.3 (Fmoc-C2, Fmoc-C7), 128.2, 127.9, 127.8, 127.3 127.2, 125.3 (Bn-C, Rotamere), 125.2 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 120.1, 120.1 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 83.0, 82.5 (C<sup>q</sup>-*t*Bu, Rotamere), 73.5 (Bn-CH<sub>2</sub>), 69.6, 69.2 (hAc-C2, Rotamere), 67.0, 66.9 (Fmoc-CH<sub>2</sub>) 50.9, 49.6 (C2, Rotamere), 48.6, (C3), 47.3 (Fmoc-C9), 39.5 (C4, Rotamere) 28.2, 28.2 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

### 5.6.6 *N*-((*N'*-(9*H*-fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-(2-(benzyloxy)-acetamid)-glycin(74a)

Fmoc-NEt-(BnO-hAc)-Gly-OH

Eine Lösung von 1.30 g (2.39 mmol) des  $\alpha$ AAP-Bausteins **74** wurden in 4 mL Anisol gelöst. Anschließend wurden 36 mL TFA zugegeben. Nach 15 min wurde die TFA im Vakuum entfernt und das Rohprodukt fünfmal mit Toluol kodestilliert. Ausbeute: 1.0 g (2.1 mmol, 87%) eines hellgelben amorphen Feststoffs.



$\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$ ,  $M = 488.53 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [488.1947].

$R_f(\text{EtOAc} + 2\% \text{ AcOH}) = 0.48$ .

HR-ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 511.1845, gef. 511.1832.

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$  = 7.89 (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H4/Fmoc-H3}} = ^3J_{\text{Fmoc-H5/Fmoc-H6}} = 7.5 \text{ Hz}$ , Fmoc-4, Fmoc-H5), 7.66 (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H1/Fmoc-H2}} = ^3J_{\text{Fmoc-H8/Fmoc-H7}} = 7.4 \text{ Hz}$ , Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.40– 7.27 (m, 9H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7, 5 x Bn-H), 4.47 (d, 2H,  $^2J_{\text{Bn-CH2a/Bn-CH2b}} = 9.3 \text{ Hz}$ , Bn-CH<sub>2</sub>), 4.33 – 4.25 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.25 – 4.16 (m, 2H, Fmoc-H9, hAc-H2a), 4.11 – 4.07 (m, 2H, hAc-H2b, H2a), 3.95 (s, 1H, H2b), 3.39 – 3.29 (m, 2H, H3a,b unter H<sub>2</sub>O-Peak), 3.20 – 3.19 (m, 2H, H4a,b) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz, HSQC, HMBC,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$  = 171.1, 170.7, 169.4, 169.2 (C1, C=O-N, Rotamere), 156.2, 156.1 (C=O, Urethan, Rotamere), 143.86, 143.81 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 140.7, 140.7 (C-4a,5a Fmoc), 137.9, 137.8 (Bn-C<sup>q</sup>), 128.9 & 128.2 (Fmoc-C3, Fmoc-C6), 128.2, 127.8, 127.8, 127.6, 127.6, 127.5, 127.06 (Bn-C, Fmoc-C2, Fmoc-C7, Rotamere), 125.1 125.1 (Fmoc-C1, Fmoc-C8, Rotamere), 120.12 (Fmoc-C4, Fmoc-

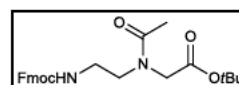
C5), 72.1, 72.0 (Bn-CH<sub>2</sub>), 68.49, 67.90 (hAc-C2), 65.4 (Fmoc-CH<sub>2</sub>) , 49.0, 47.3(C2, Rotamere), 46.7 (Fmoc-C9), 46.7 (C3), 38.6 (C4) ppm.

### 5.6.7 *N*-Acetyl-*N*-((*N*'-(9*H*-fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-glycin-*tert*.-butylester (71)<sup>[241]</sup>

Fmoc-NEt-Ac-Gly-OfBu

Variante A:

Eine Lösung von 5.00 g (12.6 mmol) Amin **70a** wurde in 100 mL Pyridin gelöst und mit 50 mL Essigsäureanhydrid versetzt. Die resultierende farblose Suspension wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in 80 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit je 50 mL 1 M Salzsäure gewaschen. Die Reinigung des Produkts erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel (EtOAc). Ausbeute: 2.3 g (5.2 mmol, 41%) eines farblosen Öls.



Variante B:

Eine Lösung von 3.3 g (7.6 mmol) Hydrochlorid **70** wurde in 100 mL Pyridin gelöst und mit 50 mL Essigsäureanhydrid versetzt. Die farblose Lösung wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in 80 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit je 50 mL 1 M Salzsäure gewaschen. Die Reinigung des Produkts erfolgte durch Säulenchromatographie (EtOAc). Ausbeute: 3.0 g (6.8 mmol, 89%) eines farblosen Öls.

C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, M = 438.52  $\frac{g}{mol}$ , [438.2155].

R<sub>f</sub>(EtOAc + 2% NEt<sub>3</sub>) = 0.46.

Massenspektrometrische Daten konnten weder mit ESI noch mit EI nicht erhalten werden.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, HSQC, COSY, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),<sup>[241]</sup> δ = 7.74 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H4/Fmoc-H3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H5/Fmoc-H6</sub> = 7.4 Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.59 (dd, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H1/Fmoc-H2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H8/Fmoc-H7</sub> = 7.4 Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.44 – 7.35 (m, 2H, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.35 – 7.24 (m, 2H, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 4.39 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-CH2/Fmoc-H9</sub> = 7.1 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Rotamere), 4.34 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-CH2/Fmoc-H9</sub> = 7.1 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Rotamere), 4.20 (t, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H9/Fmoc-CH2</sub> = 7.1 Hz, Fmoc-H9), 3.93 (s, 2H, H2, Rotamere), 3.89 (s, 2H, H2, Rotamere),

3.57 – 3.42 (m, 2H, H3a,b, Rotamere), 3.42 – 3.28 (m, 2H, H4a,b), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac, Rotamere), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac, Rotamere), 1.49, 1.48 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

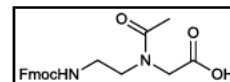
<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, HSQC, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),<sup>[241]</sup>  $\delta$  = 172.0, 171.2 (C=O-Ac, Rotamere), 169.6, 168.6 (C1, Rotamere), 156.6 (C=O, Urethan), 144.0, 143.8 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.3, 141.3 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 127.7, 127.6 (Fmoc-C3, Fmoc-C6, Rotamere), 127.1, 127.0 (Fmoc-C2, Fmoc-C7), 125.2, 125.0 (Fmoc-C1, Fmoc-C8, Rotamere), 120.0, 119.90 (Fmoc-C4, Fmoc-C5, Rotamere), 82.9, 82.2 (C<sup>q</sup>-*t*Bu, Rotamere), 66.9 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 52.3, 49.6 (C2), 50.3, 47.9 (C3), 47.2 (Fmoc-C9, Rotamere), 39.6, 39.4 (C4, Rotamere), 28.0 & 28.0 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu, Rotamere), 21.4, 21.1 (CH<sub>3</sub>-Ac, Rotamere) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[241]</sup>

### 5.6.8 *N*-Acetyl-*N*-((*N*'-(9*H*-fluoren-9-yl)-methoxy-carbonyl)-2-aminoethyl)-glycin (**71a**)<sup>[241]</sup>

Fmoc-NEt-Ac-Gly-OH

Zu einer Suspension von 2.2 g (4.9 mmol) *tert*.-Butylester **71** in 5 mL Wasser wurden 45 mL TFA zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 60 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand dreimal mit je 20 mL Toluol kdestilliert wurde. Das Produkt wurde in 2 mL Wasser aufgeschlämmt und lyophilisiert. Ausbeute: 1.9 g (4.9 mmol, quant.), farblose Kristalle.



C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, M = 382.41  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [382.1529].

R<sub>f</sub>(EtOAc + 1% AcOH) = 0.34.

Smb.: 71-76 °C.

ESI-MS (positiv, m/z): C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>, ber. 405.1426, gef. 405.1421.

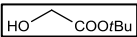
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$  = 8.31 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H4/Fmoc-H3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H5/Fmoc-H6</sub> = 7.5 Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.67 (d, 2H, J = 7.3 Hz, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.41 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H3/Fmoc-H2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H3/Fmoc-H4</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H6/Fmoc-H5</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H6/Fmoc-H7</sub> = 7.3 Hz, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.33 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H2/Fmoc-H3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H2/Fmoc-H1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H7/Fmoc-H6</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H7/Fmoc-H8</sub> = 7.0 Hz, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 4.33 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-CH2/Fmoc-H9</sub> = 6.9 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Rotamere), 4.28 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-CH2/Fmoc-H9</sub> =

6.9 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Rotamere), 4.21 (t, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-H9/Fmoc-CH}_2} = 6.7$  Hz, Fmoc-H9), 4.08 (s, 2H, H2a,b, Rotamere), 3.91 (s, 2H, H2a,b, Rotamere), 3.40 – 3.26 (m, 2H, H3a,b), 3.19 – 3.02 (m, 2H, H4a,b), 1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac, Rotamere), 1.90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac, Rotamere) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, HSQC, HMBC, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$  = 171.3, 170.9 (C1), 170.6, 170.1 (C=O-Ac, Rotamere), 156.2 (C=O, Urethan), 143.8 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 140.7 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 127.6 (Fmoc-C3, Fmoc-C6), 127.0 (Fmoc-C2, Fmoc-C7), 125.0 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 120.1 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 65.3 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 50.6 (C2, Rotamer), 48.4 (C3, Rotamer), 47.1 (C2, Rotamer), 46.7 (Fmoc-C9), 46.2 (C2, Rotamer), 38.6, 38.2 (C4), 21.3, 20.7 (CH<sub>3</sub>-Ac, Rotamere) ppm.

### 5.6.9 2-Hydroxyessigsäure-*tert*.-butylester (58)<sup>[167]</sup>

HO-hAc-O*t*Bu

Zu einer Mischung aus 5.00 g (26.0 mmol, 1.0 Äq.) Glycin *tert*.-butylester  Hydroacetat (**56**) und 2.63 g (37.5 mmol, 1.5 Äq.) Natriumnitrit in einer Suspension aus je 25 mL Wasser und Dichlormethan wurde unter starkem Rühren bei 0 °C eine Lösung von 1.70 g (12.5 mmol, 0.5 Äq.) Natriumacetat und 1.0 mL konz. Schwefelsäure in 10 mL Wasser gegeben. Die organische Phase wurde über einen Zeitraum von vier Stunden mehrmals ersetzt, bis die organische Phase keine gelbe Färbung mehr aufwies. Die vereinigten Phasen wurden mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die erhaltene Diazoniumverbindung wurde ohne weitere Reinigung in 4 mL 0.5 M Schwefelsäure gelöst und unter starkem Rühren bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Nach 14 Stunden wurden weitere 4 mL zugegeben, bis die Lösung nicht mehr gelb gefärbt war. Die Lösung wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert und mit Diethylether extrahiert. Die org. Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 2.8 g (21 mmol, 81%), eines gelblichen Öls.

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>, M = 132.16  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [132.0786].

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>),<sup>[317]</sup>  $\delta$  = 4.59 (s, 1H, OH), 3.86 (s, 2H, hAc-H2a,b), 1.41 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

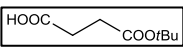
<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>),<sup>[317]</sup>  $\delta$  = 172.3 (hAc-C1), 80.4 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 60.5 (hAc-C2), 28.2 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

Massenspektroskopische Daten konnten weder mit ESI noch mit EI erhalten werden. Ebenfalls konnten keine  $R_f$ -Werte erhalten werden, da das Produkt weder mit den gängigen Reagenzien anfärbbar noch UV-aktiv ist.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[167, 318]</sup>

### 5.6.10 Bernsteinsäure mono-*tert.*-butylester (60)<sup>[168-169]</sup>

HO-BS-*Obu*

Zu einer Mischung aus 30 g (0.30 mol, 1.0 Äq.) Bernsteinsäureanhydrid  (59), 10 g (0.30 mol, 1.0 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid und 3.5 g (30 mmol, 0.1 Äq.) DMAP in 150 mL Toluol wurden 35.0 mL (371 mmol, 1.2 Äq.) *tert.*-Butanol und 12.5 mL (90.2 mmol, 0.3 Äq.) Triethylamin gegeben. Die Suspension wurde 24 h lang refluxiert, bevor die Reaktionsmischung abgekühlt und mit 150 mL EtOAc verdünnt wurde. Die organische Phase wurde mit 10%-iger Zitronensäure und mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 40.6 g (233 mmol, 78%) eines dunkelbraunen Öls.

$C_8H_{14}O_4$ ,  $M = 174.19 \frac{g}{mol}$ , [174.0892].

HR-ESI-MS (negativ,  $m/z$ ):  $C_8H_{13}O_4^-$ ,  $[M-H]^-$ , ber. 173.0819, gef. 173.0820

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ),<sup>[319]</sup>  $\delta = 2.67 - 2.47$  (m, 4H, BS-H2a,b, BS -H3a,b), 1.43 (s, 9H,  $CH_3$ -*tBu*) ppm.


$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ),<sup>[319]</sup>  $\delta = 178.5$  (BS -C1), 171.3 (BS -C4), 80.9 ( $C^q$ -*tBu*), 30.0 (BS -C3), 29.1 (BS -C2), 27.9 ( $CH_3$ -*tBu*) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[319]</sup>



### 5.6.11 $\gamma$ -Hydroxybuttersäure-*tert.*-butylester (61)<sup>[168-169]</sup>

HO- $\gamma$ HBA-*Ot*Bu

Eine Lösung von 40.6 g (233 mmol, 1.0 Äq.) HO-BS-*Ot*Bu **60** in 200 mL  absolutem Toluol wurde auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 125 mL (2.0 M, 1.1 Äq.) BH<sub>3</sub>·Me<sub>2</sub>S in THF getropft und die Lösung wurde 24 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit 100 mL Wasser verdünnt. Zu dieser Lösung wurde so lange festes Kaliumhydroxid gegeben, bis der pH-Wert 6 erreicht wurde. Das Reaktionsgemisch wurde mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 37.0 g (231 mmol, 98%) eines dunkelbraunen Öls.

C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>, M = 160.21  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [160.1099].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),<sup>[320]</sup>  $\delta$  = 3.53 (t, 2H, <sup>3</sup>J <sub>$\gamma$ HBA-H4a,b/ $\gamma$ HBA-H3a,b</sub> = 5.5 Hz,  $\gamma$ HBA-H4a,b), 3.09 (bs, 1H, OH) 2.23 (t, 2H, <sup>3</sup>J <sub>$\gamma$ HBA-H2a,b/ $\gamma$ HBA-H3a,b</sub> = 7.2 Hz,  $\gamma$ HBA-H2a,b), 1.73 (m, 2H,  $\gamma$ HBA-H3a,b), 1.34 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

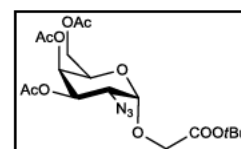
<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),<sup>[320]</sup>  $\delta$  = 173.4 ( $\gamma$ HBA-C1), 80.3 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 61.6 ( $\gamma$ HBA-C4), 32.2 ( $\gamma$ HBA-C2), 27.9 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 27.8 ( $\gamma$ HBA-C3) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[320]</sup>

### 5.6.12 *O*-(2-Azido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galctopyranosyl)-2-hydroxyessigsäure-*tert.*-butylester (62)<sup>[162, 195, 303]</sup>

$\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-*O*-hAc-*Ot*Bu

In einer Suspension von 15 g ausgeheiztem Molsieb 5 Å in 35 mL absolutem Dichlormethan und 30 mL absolutem Toluol wurden 1.35 g (10.0 mmol, 1.0 Äq.) 2-Hydroxy-Essigsäure (**58**) gelöst und unter Argon 1.5 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C gekühlt und es wurden 3.58 g (13.0 mmol, 1.3 Äq.) Silbercarbonat zugegeben. 484 mg (1.76 mmol, 0.2 Äq.) Silberperchlorat wurden dreimal mit absolutem Toluol kodestilliert, in 5 mL absolutem Toluol gelöst und zur gekühlten Reaktionsmischung gegeben. Die Suspension wurde 30 Minuten gerührt, bevor bei 0 °C 3.50 g (10.0 mmol, 1.0 Äq.) Azidochlorid **5** in 35 mL absolutem Dichlormethan und 35 mL absolutem Toluol



innerhalb von 30 Minuten zugetropft wurden. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 48 h lang gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und durch Hyflo<sup>®</sup> filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde an Kieselgel gereinigt (cHex:EtOAc = 4:1 → 3:1) gereinigt. Ausbeute 1.9 g (4.3 mmol, 43%) eines farblos amorphen Festoffs.

$C_{18}H_{27}N_3O_{10}$ ,  $M = 445.42 \frac{g}{mol}$ , [445.1696].

$R_f(cHex:EtOAc = 2.1) = 0.40$ .

$[\alpha]_D^{20} (c=1.00, CHCl_3) = +43.4$ .

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $C_{18}H_{31}N_4O_{10}^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ , ber. 463.2035, gef. 463.2034.

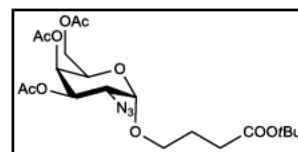
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 5.45 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H4/GalNAc-H5}$  = 1.3 Hz,  $^3J_{GalNAc-H4/GalNAc-H3}$  = 3.3 Hz, GalNAc-H4), 5.40 (dd, 1H,  $^3J_{GalNAc-H3/GalNAc-H4}$  = 3.3 Hz,  $^3J_{GalNAc-H3/GalNAc-H2}$  = 11.1 Hz, GalNAc-H3), 5.14 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H1/GalNAc-H2}$  = 3.6 Hz, GalNAc-H1), 4.34 (t, 1H,  $^3J_{GalNAc-H5/GalNAc-H6a,b}$  = 6.3 Hz, GalNAc-H5), 4.12 (dd, 2H,  $^2J_{hAc-H2a/hAc-H2b}$  = 16.2 Hz,  $J$ =38.4 Hz, hAc-H2a,b), 4.07 (dd, 2H,  $^3J_{GalNAc-H6a,b/GalNAc-H5}$  = 4.8 Hz,  $^2J_{GalNAc-H6a/GalNAc-H6b}$  = 6.8 Hz, GalNAc-H6), 3.70 (dd, 1H,  $^3J_{GalNAc-H2/GalNAc-H1}$  = 3.5 Hz,  $^3J_{GalNAc-H2/GalNAc-H3}$  = 11.1 Hz, GalNAc-H2), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.04 (2 x s, 6H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.47 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, HSQC, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 170.4, 170.0, 169.7 (C=O-Ac), 168.1 (hAc C1), 97.8 (GalNAc-C1), 82.4 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 68.2 (GalNAc-C5), 67.5 (GalNAc-C3), 67.1 (GalNAc-C4), 64.6 (hAc-C2), 61.5 (GalNAc-C6), 57.3 (GalNAc-C2), 28.0, 20.7, 20.6, 20.6 (CH<sub>3</sub>-Ac).

### 5.6.13 *O*-(2-Azido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galctopyranosyl)- $\gamma$ -hydroxybuttersäure-*tert*-butylester (63)<sup>[162, 195, 303]</sup>

$\alpha Ac_3GalN_3-O-\gamma HBA-OtBu$

In einer Suspension von 10 g ausgeheiztem Molsieb 4 Å in 35 mL absolutem Dichlormethan und 30 mL absolutem Toluol wurden 733 mg (4.58 mmol, 1.0 Äq.) 4-Hydroxybuttersäure-*tert*-butylester (61) gelöst und unter Argon 1.5 h gerührt. Die



Reaktionsmischung wurde auf 0 °C gekühlt und es wurden 1.49 g (5.40 mmol, 1.2 Äq) Silbercarbonat zugegeben. 216 mg (0.786 mmol, 0.2 Äq.) wasserfreies Silberperchlorat wurden in 60 mL absolutem Toluol gelöst und zur gekühlten Reaktionsmischung gegeben.

Die Suspension wurde 30 Minuten gerührt, bevor bei 0 °C 1.89 g (5.42 mmol, 1.2 Äq.) Azidochlorid **5** in 35 mL absolutem Dichlormethan und 35 mL absolutem Toluol innerhalb von 30 Minuten zugetropft wurden. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 48 h lang gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und durch Hyflo<sup>®</sup> filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde an Kieselgel gereinigt (cHex:EtOAc = 4:1 → 3:1) gereinigt. Ausbeute 1.15 g (2.42 mmol, 53%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

$$\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_{10}, M = 473.47 \frac{\text{g}}{\text{mol}}, [473.2009].$$

$$R_f(\text{cHex:EtOAc} = 4:1) = 0.42.$$

$$[\alpha]_D^{25} (c = 1.00, \text{CHCl}_3) = +24.8.$$

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{Na}^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 496.1907, gef. 496.1899.

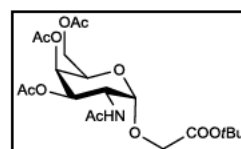
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 5.37 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H4/GalNAc-H5}} = 1.0$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H4/GalNAc-H3}} = 3.3$  Hz, GalNAc-H4), 5.28 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H4}} = 3.3$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H2}} = 11.1$  Hz, GalNAc-H3), 4.91 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1/GalNAc-H2}} = 3.5$  Hz, GalNAc-H1), 4.14 (t, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H5-GalNAc-H6a,b}} = 6.5$  Hz, GalNAc-H5), 4.05 – 3.97 (m, 2H,  $\gamma\text{HBA-H4a,b}$ ), 3.72 – 3.66 (m, 1H, GalNAc-H6a), 3.55 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H1}} = 3.5$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H3}} = 11.0$  Hz, GalNAc-H2), 3.50 – 3.44 (m, 1H, GalNAc-H6b), 2.28 (t, 2H,  $^3J_{\gamma\text{HBA-H2a,b}/\gamma\text{HBA-H3a,b}} = 7.5$  Hz,  $\gamma\text{HBA-H2a,b}$ ), 2.06, 1.97, 1.97 (3 x s, 9H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.89 – 1.81 (m, 2H,  $\gamma\text{HBA-H3a,b}$ ), 1.37 (2 x s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, HSQC, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 172.2 ( $\gamma\text{HBA-C1}$ ), 170.2, 169.9, 169.7 (C=O-Ac), 98.1 (GalNAc-C1), 80.3 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 68.1 (GalNAc-C3), 67.8 (GalNAc-C6), 67.5 (GalNAc-C4), 66.6 (GalNAc-C5), 61.6 ( $\gamma\text{HBA-C4}$ ), 57.4 (GalNAc-C2), 31.8 ( $\gamma\text{HBA-C2}$ ), 28.0 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 24.8 ( $\gamma\text{HBA-C3}$ ), 20.5 (CH<sub>3</sub>-Ac).

#### 5.6.14 *O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galctopyranosyl)-2-hydroxyessigsäure-*tert*.-butylester (**64**)<sup>[321]</sup>

$\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc-O-hAc-O-}t\text{Bu}$

Zu einer Suspension von 790 mg (11.8 mmol, 11.0 Äq) aktiviertem Zink in 50 mL einer Mischung aus THF, Essigsäureanhydrid und Essigsäure (v/v/v = 3:2:1) wurden 500 mg (1.12 mmol, 1.0 Äq)  $\alpha\text{Ac}_3\text{GalN}_3\text{-O-hAc-O-}t\text{Bu}$  **62** gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 h bei RT nachgerührt. Nach vollständigem Umsatz des Eduktes wurde die



Reaktionsmischung mit THF (70 mL) verdünnt und durch Hyflo<sup>®</sup> abfiltriert. Das Filtrat wurde konzentriert und fünfmal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Der ölige Rückstand wurde in 40 mL Dichlormethan aufgenommen, dreimal mit je 20 mL gesättigter Natriumhydrogencarboantlösung und zweimal mit je 20 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute 516 mg (1.11 mmol, 99%), farblosen amorphen Feststoffs.

$$\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NO}_{11}, M = 461.46 \frac{\text{g}}{\text{mol}}, [461.1897].$$

$$R_f(\text{EtOAc}) = 0.36.$$

$$[\alpha]_D^{20} (c = 0.50, \text{CH}_2\text{Cl}_2) = -98.8.$$

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NO}_{11}\text{Na}^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 484.1789, gef. 484.1788.

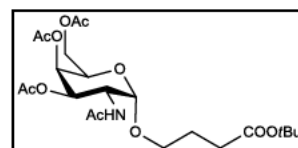
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 5.35 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H4/GalNAc-H3}}$  = 3.0 Hz, GalNAc-H4), 5.16 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H4}}$  = 3.2 Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H2}}$  = 11.3 Hz, GalNAc-H3), 4.84 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1/GalNAc-H2}}$  = 3.6 Hz, GalNAc-H1), 4.57 (ddd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H1}}$  = 3.6 Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-NH}}$  = 9.6 Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H3}}$  = 11.2 Hz, GalNAc-H2), 4.24 (t, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H5/GalNAc-H6}}$  = 6.6 Hz, 1H, GalNAc-H5), 4.12 – 4.00 (m, 4H, GalNAc-H6a,b, hAc-H2a,b), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.44 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, HSQC, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 171.0, 170.7, 170.6, 170.51, 169.0 (C=O-Ac, C=O-AcNH, hAc-C1), 99.0 (GalNAc-C1), 82.7 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 68.6 (GalNAc-C3), 67.6 (GalNAc-C4, GalNAc-C5), 67.5 (GalNAc-C4, GalNAc-C5), 65.4 (hAc-C2), 62.0 (GalNAc-C6), 47.6 (GalNAc-C2), 28.3 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 23.5, 21.0, 20.9, 20.8 (CH<sub>3</sub>-Ac) ppm.

### 5.6.15 *O*-(2-Acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galctopyranosyl)- $\gamma$ -hydroxybuttersäure-*tert*.-butylester (65) <sup>[321]</sup>

$\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc-O-}\gamma\text{HBA-O}t\text{Bu}$

Es wurden 1.15 g (2.43 mmol, 1.0 Äq.)  $\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc-O-}\gamma\text{HBA-O}t\text{Bu}$  **63** in 60 mL einer Mischung aus THF, Essigsäureanhydrid und Essigsäure (v/v/v = 3/2/1) gelöst. Die Lösung wurde mit 1.59 g (24.3 mmol, 10.0 Äq.) aktiviertem Zink versetzt und bis zum vollständigen Umsatz (DC-Kontrolle) bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mit THF verdünnt und durch Hyflo<sup>®</sup> abgesaugt. Der Rückstand wurde dreimal mit





Toluol und dreimal Dichlormethan kodestilliert und durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (cHex:EtOAc = 1:1). Ausbeute: 783 mg (1.60 mmol, 66%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

$$\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{NO}_{11}, M = 489.51 \frac{\text{g}}{\text{mol}}, [489.2210].$$

$$R_f (\text{cHex:EtOAc} = 1:1) = 0.10.$$

$$[\alpha]_D^{25} (c = 1.00, \text{CHCl}_3) = -27.3.$$

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{NO}_{11}\text{Na}^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 512.2102, gef. 512.2108,  $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{NO}_{11}^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber. 490.2283, gef. 490.2283.

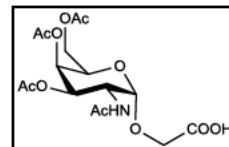
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  = 5.90 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-NH/GalNAc-H2}} = 9.7$  Hz, GalNAc-NH), 5.35 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H4/GalNAc-H5}} = 1.2$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H4/GalNAc-H3}} = 3.3$  Hz, GalNAc-H4), 5.09 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H4}} = 3.3$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H3/GalNAc-H2}} = 11.4$  Hz, GalNAc-H3), 4.82 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1/GalNAc-H2}} = 3.7$  Hz, GalNAc-H1), 4.57 (ddd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H1}} = 3.7$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-NH}} = 9.8$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H2/GalNAc-H3}} = 11.3$  Hz, GalNAc-H2), 4.14 – 4.11 (m, 1H, GalNAc-H5), 4.10 – 4.03 (m, 2H,  $\gamma\text{HBA-H4a,b}$ ), 3.73 (dt, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H6a,b/GalNAc-H5}} = 6.0$  Hz,  $^2J_{\text{GalNAc-H6a/GalNAc-H6b}} = 9.9$  Hz, GalNAc-H6a), 3.43 (dt, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H6a,b/GalNAc-H5}} = 6.0$  Hz,  $^2J_{\text{GalNAc-H6b/GalNAc-H6a}} = 9.9$  Hz, GalNAc-H6b), 2.33 (dt, 1H,  $^3J_{\gamma\text{HBA-H2a}/\gamma\text{HBA-3a,b}} = 7.3$  Hz,  $^2J_{\gamma\text{HBA-H2a}/\gamma\text{HBA-H2b}} = 15.5$  Hz,  $\gamma\text{HBA-H2a}$ ), 2.25 (dt, 1H,  $^3J_{\gamma\text{HBA-H2b}/\gamma\text{HBA-H3a,b}} = 6.9$  Hz,  $^2J_{\gamma\text{HBA-H2b}/\gamma\text{HBA-H2a}} = 15.5$  Hz,  $\gamma\text{HBA-H2b}$ ), 2.14 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 2.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 1.98 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 1.97 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 1.92 – 1.86 (m, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 1.43 (s, 9H,  $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, HSQC, HMBC,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  = 172.8 ( $\gamma\text{HBA-C1}$ ), 171.0, 170.6, 170.5, 170.4 ( $\text{C=O-Ac}$ ,  $\text{C=O-AcNH}$ ), 98.2 (GalNAc-H1), 80.9 ( $\text{C}^q\text{-}t\text{Bu}$ ), 68.7 (GalNAc-C3), 67.9 (GalNAc-C6), 67.5 (GalNAc-C4), 66.9 (GalNAc-C5), 62.1 ( $\gamma\text{HBA-C4}$ ), 47.7 (GalNAc-C2), 32.8 ( $\gamma\text{HBA-C2}$ ), 28.3 ( $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$ ), 25.1 ( $\gamma\text{HBA-C3}$ ), 23.3 ( $\text{CH}_3\text{-AcNH}$ ), 20.9, 20.8 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ) ppm.

### 5.6.16 *O*-(2-Acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galctopyranosyl)-2-hydroxyessigsäure (66)<sup>[158]</sup>

$\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc-*O*-hAc-OH

Eine Lösung von 250 mg (0.542 mmol)  $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc-*O*-hAc-*O*tBu **64** in 0.5 mL H<sub>2</sub>O und 4.5 mL TFA wurden 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde fünfmal mit Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel<sup>h</sup> (cHex:EtOAc = 1:2 → 5% MeOH + 2% AcOH in EtOAc). Ausbeute: 210 mg (0.520 mmol, 96%) eines farblosen amorphen Feststoffs.



C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>11</sub>, M = 405.35  $\frac{g}{mol}$ , [405.1271].

R<sub>f</sub>(EtOAc) = 0.14.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> (c = 0.50, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = + 0.72.

HR-ESI-MS (positiv, m/z): C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>11</sub>Na<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup>, ber. 428.1163, gef. 428.1162.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$  = 8.04 (d, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-NH/GalNAc-H2</sub> = 8.4 Hz, 1H, NH), 5.32 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H4/GalNAc-H3</sub> = 3.2 Hz, GalNAc-H4), 5.06 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H3/GalNAc-H4</sub> = 3.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H3/GalNAc-H2</sub> = 11.8 Hz, GalNAc-H3), 4.94 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H1/GalNAc-H2</sub> = 3.5 Hz, GalNAc-H1), 4.33 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H5/GalNAc-H6a,b</sub> = 6.5 Hz, GalNAc-H5), 4.26 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H2/GalNAc-H1</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H2/GalNAc-NH</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H2/GalNAc-H3</sub> = 11.9 Hz, GalNAc-H2), 4.13 (2 x s, 2H, hAc-H2a,b), 4.09 – 3.92 (m, 2H, GalNAc-H6a,b), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, HSQC, HMBC, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$  = 171.0, 170.0, 169.98, 169.7 (hAc-C1, C=O-Ac, C=O-AcNH), 97.4 (GalNAc-C1), 67.4 (GalNAc-C3), 67.1 (GalNAc-C4), 66.5 (GalNAc-C5), 64.7 (hAc-C2), 61.6 (GalNAc-C6), 46.9 (GalNAc-C2), 22.4, 20.5, 20.5, 20.4 (CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH) ppm.

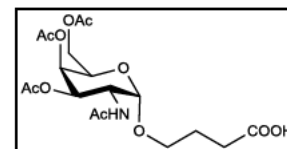
<sup>h</sup> Verzichtet man auf die Reinigung durch Säulenchromatographie, verläuft die nachfolgende Peptidkupplung mit deutlich besseren Ausbeuten.



### 5.6.17 *O*-(2-Acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galctopyranosyl)- $\gamma$ -hydroxybuttersäure (67)<sup>[158]</sup>

$\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc-*O*- $\gamma$ HBA-OH

Eine Lösung von 750 mg (1.53 mmol)  $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc-*O*- $\gamma$ HBA-*O*tBu **65** in 0.5 mL H<sub>2</sub>O und 5 mL TFA wurden bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur getührt (DC-Kontrolle). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der



Rückstand wurde fünfmal mit Toluol und Dichlormethan kdestilliert. Die Reinigung erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel<sup>i</sup> (cHex:EtOAc = 1:2 → 5% MeOH + 2% AcOH in EtOAc). Ausbeute: 643 mg (1.48 mmol, 97%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>11</sub>, M = 433.40  $\frac{g}{mol}$ , [433.1584].

R<sub>f</sub> (EtOAc) = 0.38.

HR-ESI-MS (positiv, m/z) C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>11</sub>Na<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup>, ber. 456.1476, gef. 456.1482.

HR-ESI-MS (negativ, m/z): C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>11</sub><sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>, ber. 432.1511, gef. 432.1513.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, HSQC, COSY, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 6.20 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-NH/GalNAc-H2</sub> = 9.8 Hz, GalNAc-NH), 5.34 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H4/GalNAc-HH5</sub> = 1.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H4/GalNAc-H32</sub> = 3.2 Hz, GalNAc-H4), 5.14 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H3/GalNAc-H4</sub> = 3.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H3/GalNAc-H2</sub> = 11.3 Hz, GalNAc-H3), 4.83 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H1/GalNAc-H2</sub> = 3.5 Hz, GalNAc-H1), 4.55 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H2/GalNAc-H1</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H2/GalNAc-NH</sub> = 9.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H2/GalNAc-H3</sub> = 11.3 Hz, GalNAc-H2), 4.15 – 4.11 (m, 1H, GalNAc-H5), 4.11 – 4.04 (m, 2H,  $\gamma$ HBA-H4a,b), 3.84 – 3.79 (m, 1H, GalNAc-H6a), 3.49 – 3.46 (m, 1H, GalNAc-H6b), 2.49 (ddd, <sup>3</sup>J <sub>$\gamma$ HBA-H2a/ $\gamma$ HBA-H3a</sub> = 5.2 Hz, <sup>3</sup>J <sub>$\gamma$ HBA-H22/ $\gamma$ HBA-H3b</sub> = 7.7 Hz, <sup>3</sup>J <sub>$\gamma$ HBA-H2a/ $\gamma$ HBA-H2b</sub> = 15.4 Hz,  $\gamma$ HBA-H2a), 2.37 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J <sub>$\gamma$ HBA-H2b/ $\gamma$ HBA-H3a</sub> = 5.3 Hz, <sup>3</sup>J <sub>$\gamma$ HBA-H2b/ $\gamma$ HBA-H3b</sub> = 8.2 Hz, <sup>3</sup>J <sub>$\gamma$ HBA-H2b/ $\gamma$ HBA-H2a</sub> = 15.4 Hz,  $\gamma$ HBA-H2b), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac) ppm.

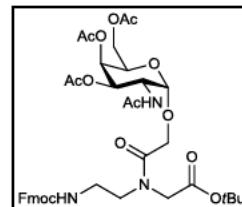
<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, HSQC, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 177.3 ( $\gamma$ HBA-C1), 171.6, 171.4, 170.7, 170.5 (C=O-Ac, C=O-AcNH), 98.1 (GalNAc-C1), 68.6 (GalNAc-C3), 67.9 (GalNAc-C6), 67.6 (GalNAc-C4), 67.2 (GalNAc-C5), 62.0 ( $\gamma$ HBA-C4), 48.1 (GalNAc-C2), 31.9 ( $\gamma$ HBA-C3), 25.2 ( $\gamma$ HBA-C2), 23.0 (CH<sub>3</sub>-AcNH), 20.9, 20.9, 20.8 (CH<sub>3</sub>-Ac) ppm.

<sup>i</sup> Verzichtet man auf die Reinigung durch Säulenchromatographie, verläuft die nachfolgende Peptidkupplung mit besseren Ausbeuten.

**5.6.18 *N*-((2-Hydroxyacetyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galctopyranosyl))-*N*-(*N'*-(9*H*-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-glycin-*tert.*-butylester (75)<sup>[241]</sup>**

Fmoc-NEt-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc-*O*-hAc)-Gly-*O**t*Bu

Unter Argon wurden 100 mg (0.246 mmol, 1.0 Äq.)  $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc-*O*-hAc-OH **66**, 321 mg (0.741 mmol, 3.0 Äq.) Hydrochlorid **70**, 122 mg (0.321 mmol, 1.3 Äq.) HATU und 43.7 mg (0.321 mmol, 1.3 Äq.) HOAt in 4 mL Pyridin gelöst und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem vollständigen Umsatz des Edukts wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der gelbliche Rückstand wurde in EtOAc (15 mL) aufgenommen, mit 10 mL 1 M Salzsäure und 15 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Produkts erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (EtOAc). Ausbeute: 150 mg (0.191 mmol, 78%), eines farblosen amorphen Feststoff



C<sub>39</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub>, M = 783.82  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [783.3215].

R<sub>f</sub>(EtOAc) = 0.25

Smb.: 73-77 °C.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> (c = 0.50, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = +30.8.

HR-ESI-MS (positiv, m/z): C<sub>39</sub>H<sub>50</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup>, ber. 784.3287, gef. 784.3283.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, HSQC, COSY, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 7.77 – 7.74 (m, 2H, Fmoc-H4, Fmoc-H5, Rotamere), 7.59 – 7.53 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8, Rotamere), 7.42 – 7.34 (m, 2H, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Rotamere), 7.33 – 7.26 (m, 2H, Fmoc-H2, Fmoc-H7, Rotamere), 6.98 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-NH/GalNAc-H2</sub> = 9.3 Hz, GalNAc-NH, Rotamere), 6.83 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-NH/GalNAc-H2</sub> = 9.3 Hz, GalNAc-NH), 5.96 - 5.90 (m, 1H, Fmoc-NH, Rotamere), 5.39 – 5.35 (m, 1H, GalNAc-H4, Rotamere), 5.30 (bs, 1H, GalNAc-H4, Rotamere), 5.19 – 5.14 (m, 1H, GalNAc-H3), 4.84 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H1/GalNAc-H2</sub> = 3.3 Hz, GalNAc-H1, Rotamere), 4.70 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H1/GalNAc-H2</sub> = 3.3 Hz, GalNAc-H1, Rotamere), 4.61 – 4.55 (m, 1H, GalNAc-H2, Rotamere), 4.53 – 4.47 (m, 1H, GalNAc-H2, Rotamere), 4.46 – 4.43 (m, 1H, Fmoc-CH<sub>2</sub>a, Rotamere), 4.40 – 4.30 (m, 4H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, hAc-H2a, Fmoc-CH<sub>2</sub>b, Rotamere), 4.29 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>hAc-CH<sub>2</sub>a/hAc-CH<sub>2</sub>b</sub> = 15.8 Hz, hAc-H2b, Rotamere), 4.25 – 4.18 (m, 3H, hAc-H2a, GalNAc-H5, hAc-H2b, Rotamere), 4.12 – 4.08 (m, 1H, GalNAc-H5, Rotamere), 4.06 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-H6a/GalNAc-H5</sub> = 6.6 Hz, GalNAc-H6a,b, Rotamere), 3.99 –

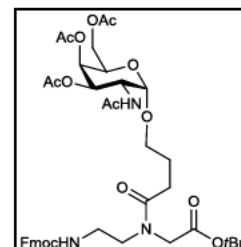
3.85 (m, 4H, GalNAc-H6a,b, H2a,b), 3.40 – 3.30 (m, 4H, H3a,b, H4a,b), 2.15, 2.14, 2.04, 2.02, 1.98, 1.97, 1.96 (7 x s, 12H, 3 x CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.49 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, HSQC, HMBC, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 170.9, 170.6, 170.5, 170.0, 169.6, 169.2, (C=O-Ac, C=O-AcNH, C1, hAc-C1), 156.8 (C=O, Urethan), 144.1 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.5 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 128.1 (Fmoc-C3, Fmoc-C6), 127.3 (Fmoc-C2, Fmoc-C7), 125.2 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 120.2 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 99.9, 99.4 (GalNAc-C1, Rotamere), 83.9, 82.8 (C<sup>q</sup>-*t*Bu, Rotamere), 68.8, 68.7 (GalNAc-C3, Rotamere), 67.5 (GalNAc-C5, Rotamere), 67.5, 67.4 (GalNAc-C4, Rotamere) 67.4 (Fmoc-CH<sub>2</sub>, Rotamere), 67.3 (GalNAc-C6), 67.0 (Fmoc-CH<sub>2</sub>, Rotamere), 65.6, 65.2 (hAc-C2, Rotamere), 62.0 (GalNAc-C6), 49.9 (C2), 48.2 (C3), 47.6, 47.6 (GalNAc-C2, Rotamere), 47.3 (Fmoc-C9), 39.3 (C4), 28.2 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 23.4, 21.0, 20.7 (CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcHN) ppm.

### 5.6.19 *N*-((4-Hydroxybutyryl)-*O*-(2-Acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galctopyranosyl))-*N*-((*N'*-(9*H*-fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-glycin-*tert.*-butylester (**76**)<sup>[241]</sup>

Fmoc-NEt-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc-*O*- $\gamma$ HBA)-Gly-*O**t*Bu

Zu einer Lösung von 610 mg (1.41 mmol, 1.0 Äq.) der freien Säure **67** und 1.22 g (2.82 mmol, 2.0 Äq.) Hydrochlorid **70** in 15 mL Pyridin wurden 590 mg (1.55 mmol, 1.1 Äq.) HATU und 211 mg (1.55 mmol, 1.1 Äq.) HOAt gegeben und die Lösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Pyridin wurde im Vakuum entfernt und der gelbe Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und dreimal gegen 1 M Salzsäure ausgeschüttelt. Die Reinigung des Produkts erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (EtOAc). Ausbeute: 930 mg (1.15 mmol, 82%) eines farblosen amorphen Feststoffs.



C<sub>41</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub>, M = 811.87  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [811.3528].

R<sub>f</sub> (EtOAc) = 0.32

HR-ESI-MS (positiv, m/z): C<sub>41</sub>H<sub>54</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup>, ber. 812.3600, gef. 812.3601.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 7.75 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H4/Fmoc-H3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H5/Fmoc-H6</sub> = 7.6 Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.61 – 7.54 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.42 – 7.35 (m, 2H, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.32 – 7.27 (m, 2H, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 6.61 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-NH/GalNAc-H2</sub> = 9.6 Hz, GalNAc-NH), 6.33 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>GalNAc-NH/GalNAc-H2</sub> = 9.6 Hz, GalNAc-NH) 6.09 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-NH/H4a,b</sub> = 6.2 Hz, Fmoc-NH), 5.55 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-</sub>



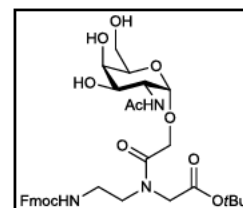
$\text{NH}/\text{H4a,b} = 6.2 \text{ Hz}$ , Fmoc-NH), 5.34 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H4}/\text{GalNAc-H3}} = 3.3 \text{ Hz}$ , GalNAc-H4), 5.18 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H4}/\text{GalNAc-H3}} = 3.3 \text{ Hz}$ , GalNAc-H4), 5.09 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H3}/\text{GalNAc-H4}} = 3.3 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{GalNAc-H3}/\text{GalNAc-H2}} = 11.3 \text{ Hz}$ , GalNAc-H3), 4.99 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H3}/\text{GalNAc-H4}} = 3.3 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{GalNAc-H3}/\text{GalNAc-H2}} = 11.3 \text{ Hz}$ , GalNAc-H3), 4.81 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1}/\text{GalNAc-H2}} = 3.5 \text{ Hz}$ , GalNAc-H1), 4.74 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1}/\text{GalNAc-H2}} = 3.5 \text{ Hz}$ , GalNAc-H1), 4.62 – 4.49 (m, 1H, GalNAc-H3), 4.47 – 4.38 (m, 1H, Fmoc-CH<sub>2</sub>a), 4.37 – 4.31 (m, 1H, Fmoc-CH<sub>2</sub>b), 4.31 – 4.16 (m, 2H, Fmoc-H9, GalNAc-H5), 4.03 – 3.90 (m, 3H, H2a, GalNAc-H6a,b), 3.88 – 3.62 (m, 2H, H2b, GalNAc-H5), 3.66 – 3.27 (m, 6H, H3a,b, H4a,b,  $\gamma\text{HBA-H4a,b}$ ), 2.52 – 2.41 (m, 1H,  $\gamma\text{HBA-H2a}$ ), 2.38 – 2.26 (m, 1H,  $\gamma\text{HBA-H2b}$ ), 2.14, 2.12, 1.99, 1.97, 1.97, 1.93 (6 x s, 12H, 3 x CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.49, 1.47, 1.46 (3 x s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, HSQC, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta = 174.3, 174.2, 173.9, 173.8, 173.6, 172.5, 171.3, 169.2, 168.9$  (C=O-Ac, C=O-AcNH, C1,  $\gamma\text{HBA-C1}$ , Rotamere), 156.9, 156.9 (C=O, Urethan), 144.0, 144.0, 143.9, 143.8 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a, Rotamere), 141.4, 141.4, 141.3 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a, Rotamere), 128.3, 127.9, 127.8, 127.5, 127.3, 127.2, 127.2 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C6, Fmoc-C7, Rotamere), 125.6, 125.2, 125.2 (Fmoc-C1, Fmoc-C8, Rotamere), 120.1, 120.1 (Fmoc-C4-Fmoc-C5), 97.9 (GalNAc-C1), 83.3, 82.6 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 68.8, 68.6 (GalNAc-C3, Rotamere), 67.8 ( $\gamma\text{HBA-C4}$ ), 67.5 (GalNAc-C4), 67.2 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 66.9 (GalNAc-C5, Rotamere), 62.7 (GalNAc-C6), 51.4, 49.9 (C2, Rotamere), 49.1 (C3, Rotamere), 48.1, 47.3 (GalNAc-C2), 47.2 (Fmoc-C9), 39.4, 38.7 (C4, Rotamere), 30.2, 30.0, 29.8 ( $\gamma\text{HBA-C2}$ ), 28.2, 28.1 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 25.0, 24.7 ( $\gamma\text{HBA-C3}$ , Rotamere), 23.1, 23.0, 21.9, 21.2, 20.8 (CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH) ppm.

### 5.6.20 *N*-((2-Hydroxyacetyl)-*O*-(2-Acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galctopyranosyl))-*N*-(*N'*-((9H-fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-glycin-*tert.*-butylester (77)

Fmoc-NEt-( $\alpha\text{GalNAc-O-hAc}$ )-Gly-*O**t*Bu

Eine Lösung von 1.00 g (1.28 mmol) Fmoc-NEt-( $\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc-O-hAc}$ )-Gly-*O**t*Bu **75** wurde in 10 mL Methanol p.a. gelöst und so lange mit einer 2%igen Natriummethanolatlösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5-8.8 erreicht wurde. Der pH-Wert wurde alle 30 min kontrolliert und ggf. reguliert. Nach einer Reaktionszeit von 16 h



wurde die Lösung mit 1 M Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in 15 mL Acetonitril aufgenommen. Die Lösung wurde mit 50 mg (0.15 mmol, 0.1 Äq.) Fmoc-OSu und mit 50  $\mu\text{L}$  (0.26 mmol, 0.2 Äq.) DIPEA versetzt und weitere 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der

Rückstand wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (EtOAc:EtOH = 9:1). Ausbeute: 460 mg (0.699 mmol, 55%) eines farblos amorphen Feststoffs.

$C_{33}H_{43}N_3O_{11}$ ,  $M = 657.71 \frac{g}{mol}$ , [657.2898].

$R_f$  (EtOAc:EtOH = 9:1) = 0.13.

HR-ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $C_{33}H_{44}N_3O_{11}^+$ ,  $[M+H]^+$ , ber. 658.2970, gef. 658.2960.

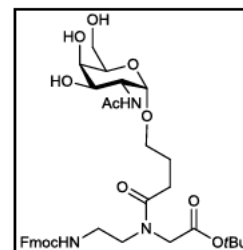
$^1H$ -NMR (600 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  = 8.32 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-NH/GalNAc-H2}$  = 5.8 Hz, GalNAc-NH), 8.29 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-NH/GalNAc-H2}$  = 6.2 Hz, GalNAc-NH), 7.74 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H4/Fmoc-H3}$  =  $^3J_{Fmoc-H5/Fmoc-H6}$  = 7.6 Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.61 – 7.54 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.38 (t, 2H,  $^3J_{Fmoc-H3/Fmoc-H2}$  =  $^3J_{Fmoc-H3/Fmoc-H4}$  =  $^3J_{Fmoc-H6/Fmoc-H5}$  =  $^3J_{Fmoc-H6/Fmoc-H7}$  = 7.4 Hz, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.31 – 7.27 (m, 2H, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 6.09 (m, 1H, Fmoc-NH), 5.62 (t, 1H,  $^3J_{Fmoc-NH/H4a,b}$  = 5.6 Hz, Fmoc-NH), 4.81 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H1/GalNAc-H2}$  = 3.7 Hz, GalNAc-H1), 4.72 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H1/GalNAc-H2}$  = 3.7 Hz, GalNAc-H1), 4.47 – 4.31 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, hAc-H2a), 4.22 – 4.16 (m, 2H, Fmoc-H9, hAc-H2b), 4.08 – 4.03 (m, 1H, GalNAc-H2), 3.97 (m, 1H, H2a), 3.91 – 3.69 (m, 7H, H2b, GalNAc-H3, GalNAc-H4, GalNAc-H5, GalNAc-H6a,b), 3.62 – 3.26 (m, 4H, H3a,b, H4a,b), 2.05, 2.02 (2 x s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.48, 1.47 (2 x s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

$^{13}C$ -NMR (150 MHz, HSQC, HMBC,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  = 174.0, 171.4, 171.3, 171.0, 168.9, 168.2 (C1, hAc-C1, C=O-AcNH, Rotamere), 156.9, 156.8 (C=O, Urethan, Rotamere), 143.9, 143.8 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.4 (Fmoc-C4a, Fmoc-C8a), 128.3, 127.9, 127.2 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C6, Fmoc-C7), 125.2, 125.1 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 120.1 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 98.9 (GalNAc-C1), 83.9, 82.8 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 71.1, 70.9 (GalNAc-C3, Rotamere), 70.6, 70.5 (GalNAc-C4), 69.2 (GalNAc-C5), 67.2, 66.8 (Fmoc-CH<sub>2</sub>, Rotamere), 64.9 (hAc-C2, Rotamere), 62.9, 62.7 (GalNAc-C6), 51.8, 51.6 (GalNAc-C2), 50.2, 49.8 (C2), 48.6, 47.9 (C3), 47.3, 47.3 (Fmoc-C9, Rotamere), 39.1 (C4), 29.8, 28.1 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 23.0, 22.9, 21.2 (CH<sub>3</sub>-AcNH) ppm.

### 5.6.21 *N*-((4-Hydroxybutyryl)-*O*-(2-Acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galctopyranosyl))-*N*-(*N'*-((9H-fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-glycin-*tert.*-butylester (78)

Fmoc-NEt-( $\alpha$ GalNAc-*O*- $\gamma$ HBA)-Gly-*O**t*Bu

Eine Lösung von 930 mg (1.25 mmol) Fmoc-NEt-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc-*O*- $\gamma$ HBA)-Gly-*O**t*Bu **76** in 5 mL Methanol p.a. wurde so lange mit einer 2%igen Natriummethanolatlösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5–8.8 erreicht wurde. Der pH-Wert wurde alle 30 min kontrolliert und ggf. reguliert. Nach einer Reaktionszeit von 16 h wurde die Lösung



mit 1 M Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in 15 mL Acetonitril aufgenommen. Die Lösung wurde mit 78 mg (0.23 mmol, 0.2 Äq.) Fmoc-OSu und mit 39  $\mu$ L (0.23 mmol, 0.2 Äq.) DIPEA versetzt und weitere 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (EtOAc:EtOH = 9:1). Ausbeute: 480 mg (0.700 mmol, 61%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

$C_{35}H_{47}N_3O_{11}$ ,  $M = 685.76 \frac{g}{mol}$ , [685.3211].

$R_f$ (EtOAc:EtOH = 9:1) = 0.16.

Massenspektrometrische Daten konnten mit ESI nicht erhalten werden.

$^1H$ -NMR (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  = 7.75 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H4/Fmoc-H3} = ^3J_{Fmoc-H5/Fmoc-H6} = 7.6$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.61 – 7.54 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.42 – 7.35 (m, 2H, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.32 – 7.27 (m, 2H, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 7.23 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-NH/GalNAc-H2} = 8.2$  Hz, GalNAc-NH), 7.01 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-NH/GalNAc-H2} = 8.2$  Hz, GalNAc-NH), 6.09 (t, 1H,  $^3J_{Fmoc-NH/H4a,b} = 6.2$  Hz, Fmoc-NH), 5.71 (t, 1H,  $^3J_{Fmoc-NH/H4a,b} = 5.8$  Hz, Fmoc-NH), 4.78 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H1/GalNAc-H2} = 3.7$  Hz, GalNAc-H1), 4.74 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H1/GalNAc-H2} = 3.7$  Hz, GalNAc-H1), 4.42 – 4.31 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.31 – 4.16 (m, 2H, GalNAc-H2, Fmoc-H9), 4.03 – 3.90 (m, 2H, H2a, GalNAc-H5), 3.88 – 3.62 (m, 6H, H2b, GalNAc-H6a,b, GalNAc-H4, GalNAc-H3,  $\gamma$ HBA-H4a), 3.60 – 3.27 (m, 5H,  $\gamma$ HBA-H4a, H3a,b, H4a,b), 2.46 (t, 2H  $^3J_{\gamma HBA-H2a,b/\gamma HBA-H3a,b} = 6.9$  Hz,  $\gamma$ HBA-H2a,b), 2.06, 2.05 (3 x s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.47, 1.47 (2 x s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

$^{13}C$ -NMR (100 MHz, HSQC, HMBC,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  = 174.3, 174.2, 173.9, 173.8, 173.6, 172.5, 171.3, 169.6, 168.9 (C1,  $\gamma$ HBA-C1, C=O-AcNH, Rotamere), 156.9, 156.9 (C=O, Urethan), 144.0, 144.0, 143.9, 143.8 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.4, 141.4, 141.3 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 128.3, 127.9, 127.8, 127.5, 127.3, 127.2, 127.2 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C6, Fmoc-C7), 125.6, 125.2, 125.2 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 120.1, 120.1 (Fmoc-C4,

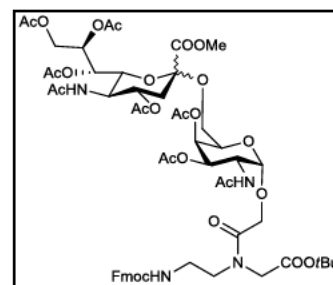


Fmoc-C5), 97.9 (GalNAc-C1), 83.3, 82.6 (C<sup>q</sup>-*t*Bu, Rotamere), 70.7 (GalNAc-C3), 69.9, 69.8 (GalNAc-C4), 69.7, 69.6 (GalNAc-C5), 67.4, 67.2 ( $\gamma$ HBA-C4, Rotamere), 66.9 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 62.7 (GalNAc-C6), 51.6 (C2, Rotamere), 50.9, 50.7 (GalNAc-C2, Rotamere), 49.8 (C2, Rotamere), 49.4, 48.1 (C3, Rotamere), 47.3, 47.2 (Fmoc-C9, Rotamere), 39.4, 38.7 (C4), 30.2, 30.0, 29.8 ( $\gamma$ HBA-C2), 28.2, 28.1 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 25.5, 25.0, 24.7 ( $\gamma$ HBA-C3), 23.1, 23.0, 21.9, 21.2, 20.8 (CH<sub>3</sub>-AcNH) ppm

**5.6.22 *N*-(2-Hydroxyacetyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-(methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- $\alpha$ / $\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)-onat)- $\alpha$ -D-galctopyranosyl)-*N*-(*N'*-((9*H*-fluoren-9-yl)-methoxy-carbonyl)-2-aminoethyl)-glycin-*tert.*-butylester (79)**

Fmoc-NEt-( $\alpha$ / $\beta$ Ac<sub>4</sub>NeuNAc(2 $\rightarrow$ 6) $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc-*O*-hAc)-Gly-*Or*Bu

Eine Lösung von 460 mg (0.700 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-NEt-( $\alpha$ GalNAc-*O*-hAc)-Gly-*Or*Bu **77** und 1.65 g (2.77 mmol, 4.0 Äq.) Xanthogenat **14** wurden in 80 mL Acetonitril und 40 mL Dichlormethan mit 10 g Molsieb 4 Å 24 h unter Lichtausschluss und unter Feuchtigkeitsausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde auf -45 °C gekühlt und mit 540 mg (2.10 mmol, 3.0 Äq.) trockenem Silbertriflat versetzt. Anschließend wurden innerhalb von 15 min 1.3 mL (1.6 N, 2.1 mmol, 3.0 Äq.) einer auf 0 °C gekühlten Methylsulphenylbromidlösung in absolutem 1,2-Dichlormethan hinzuge tropft. Die Lösung wurde 6 h bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit DIPEA neutralisiert und mit 100 mL Dichlormethan verdünnt. Die Reaktionsmischung wurde durch Hyflo<sup>®</sup> filtriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Zur Acetylierung wurde der Rückstand in 10 mL Pyridin aufgenommen und mit 5 mL Acetanhydrid und katalytischen Mengen DMAP versetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 h lang gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (EtOAc:EtOH = 10:1). Ausbeute: 198 mg (0.163 mmol, 23%) ( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 6) und 201 mg (0.165 mmol, 24%) ( $\beta$ 2 $\rightarrow$ 6) eines farblosen amorphen Feststoffs.



C<sub>57</sub>H<sub>74</sub>N<sub>4</sub>O<sub>25</sub>, M = 1215.46  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [1214.4642]

$\alpha$ -Anomer:

R<sub>t</sub> (40% – 60% – 100% MeCN) = 13.8 min.

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $C_{57}H_{75}N_4O_{25}^+$ ,  $[M+H]^+$ , ber. 1215.4715, gef. 1215.4719.

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $C_{57}H_{74}N_4O_{25}Na^+$ ,  $[M+Na]^+$ , ber. 1237.4534, gef. 1237.4548.

$^1H$ -NMR (600 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  = 7.76 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H4/Fmoc-H3} = ^3J_{FmocH5/Fmoc-H6} = 7.5$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.60 – 7.57 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.41 – 7.38 (m, 2H, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.33 – 7.29 (m, 2H, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 7.04 (t (möglicherweise auch 2 x d), 1H,  $^3J_{GalNAc-NH/GalNAc-H2} = 9.5$  Hz, GalNAc-NH), 5.98 (m, 1H Fmoc-NH), 5.42 – 5.37 (m, 1H, GalNAc-H4), 5.37 – 5.28 (m, 2H, Sia-H7, Sia-H8), 5.27 – 5.21 (m, 1H, NH?), 5.21 – 5.11 (m, 1H, GalNAc-H3, Rotamere), 4.89 – 4.81 (m, Sia-H4, GalNAc-H1), 4.79 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H1/GalNAc-H2} = 3.5$  Hz, GalNAc-H1), 4.55 – 4.48 (m, 1H, GalNAc-H2), 4.46 – 4.32 (m, 4H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, hAc-H2a,b), 4.30 – 4.16 (m, Sia-H9a, Fmoc-H9, GalNAc-H5), 4.11 – 4.04 (m, 2H, Sia-H9b, Sia-H6), 4.03 – 3.97 (m, 1H, Sia-H3), 3.96 – 3.89 (m, 2H, H2a,b), 3.81 – 3.68 (m, 4H, GalNAc-H6a, O-CH<sub>3</sub>), 3.42 – 3.26 (m, 5H, H3a,b, H4a,b, GalNAc-H6b), 2.58 – 2.47 (m, 1H, Sia-H3äq.), 2.15 – 2.10 (m, 9H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.03 – 1.96 (m, 12H, CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.90 (d, 1H,  $J = 2.8$  Hz, Sia-H3ax.) 1.87 (CH<sub>3</sub>-Ac-NH), 1.48, 1.47 (2 x s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

$^{13}C$ -NMR (100 MHz, HSQC, HMBC,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  = 171.3, 171.1, 171.0, 170.9, 170.9, 170.8, 170.8, 170.5, 170.5, 170.4, 170.4, 170.3, 170.3, 170.3, 170.0, 169.7, 168.9, 168.4, 167.9, 167.8 (C=O-Ac, C=O-AcNH, C1, Sia-C1, hAc-C1, Rotamere), 156.7 (C=O, Urethan), 144.0, 144.0, 143.9 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.4 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 127.9, 127.8, 127.2, 127.2 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C6, Fmoc-C7), 125.2 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 120.1 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 99.4, 99.3 (GalNAc-C1, Rotamere), 99.0, 98.9 (Sia-C2, Rotamere), 83.7, 82.7 (C<sup>q</sup>-*t*Bu, Rotamere), 72.6 (Sia-C6), 69.0 (GalNAc-C3), 68.9 (Sia-C4), 68.40 (GalNAc-C5, Sia-C8), 67.4 (GalNAc-C4), 67.3 (Sia-C7), 67.0, 66.9 (hAc-C2, Rotamere), 65.0 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 63.0 (GalNAc-C6), 62.2 (Sia-C9), 53.0 (O-CH<sub>3</sub>), 50.5, 49.6 (C2, Rotamere), 49.5 (Sia-C5), 48.2 (C3), 47.8 (GalNAc-C2), 47.72, 47.3 (Fmoc-C9, Rotamere), 39.3 (C4), 38.0, 37.9 (Sia-C3, Rotamere), 28.1 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 23.3 (CH<sub>3</sub>-AcNH), 23.3 (CH<sub>3</sub>-AcNH), 21.20 (CH<sub>3</sub>-Ac), 21.0 (CH<sub>3</sub>-Ac), 20.9 (CH<sub>3</sub>-Ac) ppm.

$\beta$ -Anomer:

$R_t$  (40% – 60% – 100% MeCN) = 15.2 min.

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $C_{57}H_{75}N_4O_{25}^+$ ,  $[M+H]^+$ , ber. 1215.4715, gef. 1215.4721,  $C_{57}H_{74}N_4O_{25}Na^+$ ,  $[M+Na]^+$ , ber. 1237.4534, gef. 1237.4546.

$^1H$ -NMR (600 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  = 7.76 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H4/Fmoc-H3} = ^3J_{FmocH5/Fmoc-H6} = 7.5$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.61 – 7.55 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.41 – 7.36 (m, 2H, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.33 – 7.28 (m, 2H, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 6.93 – 6.78 (m, 1H, GalNAc-NH), 5.47 (bs, 1H, GalNAc-H4, Rotamere), 5.41 (bs, 1H,

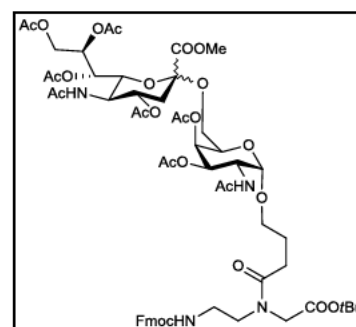
GalNAc-H4, Rotamere), 5.35 - 5.32 (m, 1H, Sia-H7), 5.27 - 5.19 (m, 2H, GalNAc-H5, GalNAc-H3), 5.15 - 5.07 (m, 1H, Sia-H8), 4.90 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1/GalNAc-H2}} = 3.2$  Hz, GalNAc-H1, Rotamere), 4.84 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1/GalNAc-H2}} = 3.2$  Hz, GalNAc-H1, Rotamere), 4.78 - 4.68 (m, 1H, Sia-H9a), 4.62 - 4.52 (m, 1H, GalNAc-H2), 4.47 - 4.33 (m, 4H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, hAc-H2a,b), 4.23 (t, 1H,  $^3J_{\text{Fmoc-H9/Fmoc-CH2}} = 6.5$  Hz, Fmoc-H9), 4.16 - 4.08 (m, 1H, Sia-H5), 4.06 - 4.00 (m, 1H, Sia-H9b), 3.99 - 3.81 (m, 3H, H2a,b, Sia-H6), 3.78 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>, Rotamere), 3.73 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>, Rotamere), 3.61 - 3.42 (m, 4H, H3a,b, GalNAc-H6a,b), 3.45 - 3.24 (m, 2H, H4a,b), 2.46 (dd, 1H,  $^3J_{\text{Sia-H3äq/Sia-H4}} = 5.0$  Hz,  $^2J_{\text{Sia-H3äq/Sia-H3ax}} = 13.0$  Hz, Sia-H3äq), 2.20, 2.14 (2 x s, 6H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.05 - 1.96 (m, 15H, CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.85 - 1.78 (m, 1H, Sia-H3ax), 1.48, 1.48 (2 x s, 6H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, HSQC, HMBC, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171.1, 171.1, 171.0, 170.9, 170.9, 170.8, 170.7, 170.6, 170.3, 170.2, 169.6, 168.9, 167.2, 167.1 (C=O-Ac, C=O-AcNH, C1, Sia-C1, hAc-C1, Rotamere), 156.9, 156.8 (C=O, Urethan, Rotamere), 144.0, 143.9 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.5 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 127.9, 127.2, 127.2 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C6, Fmoc-C7), 125.1 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 120.1 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 98.8 (GalNAc-C1, Neu-C2), 83.8, 82.9 (C<sup>q</sup>-*t*Bu, Rotamer), 72.1 (Sia-C6), 69.0 (GalNAc-C5), 68.7 (GalNAc-C3, Sia-C7), 68.4 (Sia-C4), 68.3, 68.2 (GalNAc-C4), 67.1, 66.8 (hAc-C2), 65.9, 65.2 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 62.6, 62.5 (Sia-C9, GalNAc-C6), 61.82, 52.9 (O-CH<sub>3</sub>), 50.9, 49.8 (C2, Rotamer), 48.73, 48.5 (C3), 48.4 (Sia-C5), 48.0, 47.8 (GalNAc-C2, 47.8, 47.3 (Fmoc-C9), 39.4, 39.2 (C4), 37.1 (Sia-C3), 28.2 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 23.24, 23.18, 21.15, 21.04, 20.90, 20.83 ppm.

### 5.6.23 *N*-(4-Hydroxybutyryl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-(methyl(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- $\alpha$ / $\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)-onat)- $\alpha$ -D-galctopyranosyl)-*N*-(*N'*-(9H-fluoren-9-yl)-methoxy-carbonyl)-2-aminoethyl)-glycin-*tert*-butylester (80)

Fmoc-NEt-( $\alpha$ / $\beta$ Ac<sub>4</sub>NeuNAc(2 $\rightarrow$ 6) $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc-*O*- $\gamma$ HBA)-Gly-*O**t*Bu

Eine Lösung von 480 mg (0.700 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-NEt-( $\alpha$ GalNAc-*O*- $\gamma$ HBA)-Gly-*O**t*Bu **78** und 1.65 g (2.77 mmol, 4.0 Äq.) Xanthogenat **14** wurden in 80 mL Acetonitril und 40 mL Dichlormethan mit 10 g ausgeheiztem Mosieb 4 Å 24 h unter Lichtausschluss und unter Feuchtigkeitsausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde auf -45 °C gekühlt und es wurden 540 mg (2.10 mmol, 3.0 Äq.) trockenes Silbertriflat zugegeben. Anschließend wurden innerhalb



von 15 min 1.3 mL (1.6 N, 2.1 mmol, 3.0 Äq.) einer auf 0 °C Methylsulfonylbromidlösung in absolutem 1,2-Dichlorethan zugetropft. Die Lösung wurde 6 h bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit DIPEA neutralisiert und mit 100 mL Dichlormethan verdünnt. Die Reaktionsmischung wurde durch Hyflo<sup>®</sup> filtriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Zur Acetylierung wurde der Rückstand in 10 mL Pyridin aufgenommen und mit 5 mL Acetanhydrid und katalytischen Mengen DMAP versetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 h lang gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (EtOAc:EtOH = 10:1). Ausbeute: 320 mg (0.257 mmol, 37%) ( $\alpha$ 2→6) und 298 mg (0.240 mmol, 34%) ( $\beta$ 2→6) eines farblosen amorphen Feststoffs.

$C_{59}H_{78}N_4O_{25}$ ,  $M = 1243.26 \frac{g}{mol}$ , [1242. 4955].

$\alpha$ -Anomer:

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $C_{59}H_{78}N_4O_{25}Na^+$ ,  $[M+Na]^+$ , ber. 1265.4847, gef. 1265.4863.

<sup>1</sup>H-NMR (599 MHz, HSQC, COSY, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta = 7.79 - 7.72$  (m, 2H, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.60 – 7.57 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.43 – 7.37 (m, 2H, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.33 – 7.28 (m, 2H, Fmoc-H2, Fmoc-H7), 6.89 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-NH/GalNAc-H2} = 9.7$  Hz, GalNAc-NH), 6.06 (t, 1H,  $^3J_{Fmoc-NH/H4a,b} = 6.1$  Hz, Fmoc-NH), 5.44 – 5.18 (m, 3H, GalNAc-H4, GalNAc-H3, Sia-H7, Sia-H8), 4.99 (dd, 1H,  $^3J_{GalNAc-H3/GalNAc-H4} = 2.9$  Hz,  $^3J_{GalNAc-H3/GalNAc-H2} = 11.3$  Hz, GalNAc-H3), 4.87 – 4.71 (m, 2H, Fmoc-H9, GalNAc-H1), 4.58 – 4.48 (m, 1H, GalNAc-H2), 4.47 – 4.40 (m, 1H, Fmoc-CH<sub>2</sub>a), 4.38 – 4.24 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>b, Sia-H9a), 4.21 (t, 1H,  $^3J_{Fmoc-H9/Fmoc-CH2} = 7.0$  Hz, Fmoc-H9), 4.08 (dd,  $^3J_{Sia-H9b/Sia-H8} = 5.3$  Hz,  $^3J_{Sia-H9b/Sia-H9a} = 12.3$  Hz, Sia-H9b), 4.05 – 3.96 (m, 3H, Sia-H5, Sia-H6, H2a), 3.89 – 3.72 (m, 6H, H2b, GalNAc-H4, GalNAc-H6a, O-CH<sub>3</sub>), 3.71 – 3.52 (m, 2H,  $\gamma$ HBA-H4a, H3a), 3.51 – 3.18 (m, 4H, H4a,b, GalNAc-H6b,  $\gamma$ HBA-H4b, H3b), 2.53 (dd, 1H,  $^3J_{Sia-H3\ddot{a}q/Sia-H4} = 4.6$  Hz,  $^2J_{Sia-H3\ddot{a}q/Sia-H3ax} = 13.0$  Hz, Sia-H3 $\ddot{a}q$ ), 2.50 – 2.30 (m, 2H,  $\gamma$ HBA-H2a,b), 2.16 -1.83 (m, 26H, CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH, Sia-H3ax,  $\gamma$ HBA-H3a), 1.79 – 1.62 (m, 1H,  $\gamma$ HBA-H3b), 1.48 (bs, 9H, CH<sub>3</sub>-tBu) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, HSQC, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta = 174.3, 174.0, 171.7, 171.5, 171.4, 171.2, 171.1, 170.0, 170.9, 170.78, 170.7, 170.5, 170.3, 170.2, 169.9, 169.7, 167.9, 167.0$  (C=O-Ac, C=O-AcNH, Sia-C1, C1,  $\gamma$ HBA-C1, Rotamere), 157.0 (C=O, Urethan), 144.0, 144.0, 143.7 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.4 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 128.0, 127.9, 127.82, 127.3, 127.2, 127.2 (Fmoc-C2, Fmoc-3, Fmoc-C6, Fmoc-C7), 125.3, 125.2, 124.4 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 120.2, 120.1 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 98.7, 98.6, 98.5 (Sia-C2, Rotamere), 98.2, 98.1 (GalNAc-C1, Rotamere), 83.3, 82.5 (C<sup>q</sup>-tBu, Rotamer), 72.6 (Sia-C6), 69.0 (Sia-C4), 68.8 (GalNAc-C3), 68.4 (Sia-C8), 68.0, 67.8 (GalNAc-C5), 67.7 (GalNAc-C4), 67.6 ( $\gamma$ HBA-C4), 67.4 (Sia-C7), 66.9 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 63.2 (GalNAc-C6), 62.4 (Sia-C9), 53.0

(*O*-CH<sub>3</sub>), 51.6, 50.1 (C2), 49.6, 49.4 (Sia-C5), 49.3 (C3), 47.8 (GalNAc-C2), 47.4, 47.1 (Fmoc-C9), 39.5 (C4), 37.9 (Sia-C3), 30.3, 30.0 ( $\gamma$ HBA-C2), 28.2 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 25.1, 24.8 ( $\gamma$ HBA-C3), 23.3, 23.0, 22.8, 21.3, 21.2, 21.0, 21.0, 20.9 (CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH) ppm.

$\beta$ -Anomer:

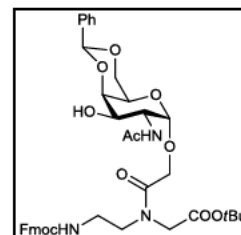
HR-ESI-MS (positiv, *m/z*): C<sub>59</sub>H<sub>79</sub>N<sub>4</sub>O<sub>25</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup>, ber. 1243.5028, gef. 1243.5038, C<sub>59</sub>H<sub>78</sub>N<sub>4</sub>O<sub>25</sub>Na<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup>, ber. 1265.4847, gef. 1265.4861.

Eine Auswertung der NMR-Spektren für das  $\beta$ -Anomer war aufgrund einer unzureichenden Spektrenqualität nicht möglich.

#### 5.6.24 *N*-((2-Hydroxyacetyl)-*O*-(2-Acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- $\alpha$ -D-galctopyranosyl)-*N*-(*N*'-(9*H*-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-glycin-*tert.*-butylester (81)

Fmoc-NEt-( $\alpha$ -4,6-BnzGalNAc-*O*-hAc)-Gly-*O**t*Bu

Eine Lösung von 320 mg (0.486 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-NEt-( $\alpha$ GalNAc-*O*-hAc)-Gly-*O**t*Bu **77** wurde in 8 mL Acetonitril p.a. gelöst und mit 0.30 mL (2.0 mmol, 4.0 Äq.) Benzylidendimethylacetal versetzt. Der pH-Wert wurde mit para-Toluolsulfonsäure auf 4 eingestellt und die Reaktionslösung wurde anschließend 3 h lang auf 40 °C erwärmt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle!) wurde die Lösung mit DIPEA neutralisiert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Produkts erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (EtOAc:EtOH = 5:1). Ausbeute 200 mg (0.268 mmol, 54%) eines farblosen amorphen Feststoffs.



C<sub>40</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>, M = 745.81  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [745.3211]

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, HSQC, COSY, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 7.76 (d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>Fmoc-H4/Fmoc-H3</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>Fmoc-H5/Fmoc-H6</sub> = 7.5 Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.63 – 7.55 (m, 2H, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.54 – 7.47 (m, 2H, Bn-H), 7.40 (t, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>Fmoc-H3/Fmoc-H2</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>Fmoc-H3/Fmoc-H4</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>Fmoc-H6/Fmoc-H5</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>Fmoc-H6/Fmoc-H7</sub> = 7.4 Hz, Fmoc-H3, Fmoc-H6), 7.36 – 7.28 (m, 5H, Fmoc-H2, Fmoc-H7, Bn-H), 5.93 (t, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>Fmoc-NH/H4a,b</sub> = 5.7 Hz, Fmoc-NH), 5.58 (s, 1H, Bnz-H), 5.53 (s, 1H, Bnz-H), 5.32 (m, 1H, Fmoc-NH), 4.88 (d, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>GalNAc-H1/GalNAc-H2</sub> = 3.4 Hz, GalNAc-H1), 4.79 (d, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>GalNAc-H1/GalNAc-H2</sub> = 3.4 Hz, GalNAc-H1), 4.50 (dd, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>hAc-H2a/H3a,b</sub> = 7.3 Hz, <sup>2</sup>*J*<sub>hAc-H2a/hAc-H2b</sub> = 10.5 Hz, hAc-2a), 4.44 – 4.30 (m, 3H, Fmoc-CH2a, GalNAc-H2, hAc-2b), 4.27 – 4.14 (m, 3H, GalNAc-H6a, Fmoc-H9, Fmoc-CH2b), 4.10 – 3.97 (m, 3H,



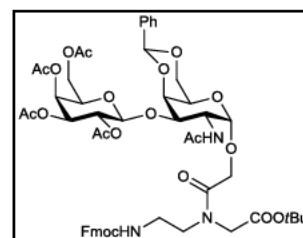
H2a, GalNAc-H6b, GalNAc-H4), 3.95 (s, 0H), 3.92 (s, 0H), 3.88 – 3.72 (m, 2H, H2b, GalNAc-H3), 3.62 – 3.59 (m, 1H, GalNAc-H5), 3.52 – 3.26 (m, 4H, H3a,b, H4a,b), 2.07, 2.06 (2 x s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.50, 1.49 (2 x s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, HSQC, HMBC, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  = 173.3, 173.0, 170.7, 169.4, 169.1, 167.4 (C=O, AcNH, C1, hAc-C1, Rotamere), 156.8 (C=O, Urethan), 143.8, 142.6 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.4 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 137.8, 137.7 (C<sup>q</sup>-Bn), 129.1, 128.3, 128.2, 127.9, 127.3 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C6, Fmoc-C7, Bn-C), 125.2 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 120. (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 101.2 (Bzn-CH), 100.3 (GalNAc-C1), 84.0, 83.0 (C<sup>q</sup>-*t*Bu), 75.5 (GalNAc-C4), 70.3 (GalNAc-C3), 69.3 (GalNAc-C6), 67.2 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 65.0 (hAc-C2), 63.8 (GalNAc-C5), 51.3 (GalNAc-C2), 50.0 (C2), 48.1 (C3), 47.3 (Fmoc-C9), 39.2 (C4), 28.2 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 25.47, 23.1, 21.2 (CH<sub>3</sub>-AcNH) ppm.

#### 5.6.25 *N*-((2-Hydroxyacetyl)-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galacto-pyranosyl]- $\alpha$ -D-galacto-pyranosyl)-*N*-(*N*'-(9*H*-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-glycin-*tert*.-butylester (82)

Fmoc-NEt-( $\beta$ Ac<sub>4</sub>Gal(1 $\rightarrow$ 3) $\alpha$ -4,6-BnzGalNAc-*O*-hAc)-Gly-*O**t*Bu

Eine Lösung von 555 mg (1.38 mmol, 5.0 Äq.) Acetylbromid **3** und 200 mg (0.268 mmol, 1.0 Äq.) Fmoc-NEt-( $\alpha$ -4,6-BnzGalNAc-*O*-hAc)-Gly-*O**t*Bu **81** wurden in 12 mL einer Mischung aus absolutem Nitromethan und absolutem Dichlormethan (v/v = 1:3) mit 2.00 g Molsieb 4 Å unter Argonatmosphäre 1 h vorgerührt, bevor 136 mg (0.538 mmol, 2.0 Äq.)



trockenes Quecksilber(II)cyanid hinzugefügt wurde. Die Suspension rührte 16 h bei Raumtemperatur, wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und schließlich durch Hyflo® filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (EtOAc). Ausbeute: 215 mg (0.200 mmol, 73%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

C<sub>54</sub>H<sub>65</sub>N<sub>3</sub>O<sub>20</sub>, M = 1076.10  $\frac{g}{mol}$ , [1075.4161].

R<sub>f</sub>(EtOAc) = 0.26.

HR-ESI-MS (positiv, m/z): C<sub>54</sub>H<sub>66</sub>N<sub>3</sub>O<sub>20</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup>, ber. 1076.4234, gef. 1076.4227, C<sub>54</sub>H<sub>69</sub>N<sub>4</sub>O<sub>20</sub><sup>+</sup>, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, ber. 1093.4500, gef. 1093.4502, C<sub>54</sub>H<sub>65</sub>N<sub>3</sub>O<sub>20</sub>Na<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup>, ber. 1098.4054, gef. 1098.4059.



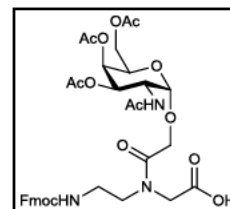
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, HSQC, COSY, HMBC,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  = 7.75 (d, 2H,  $^3J_{\text{Fmoc-H4/Fmoc-H3}} = ^3J_{\text{Fmoc-H5/Fmoc-H6}} = 7.5$  Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.63 – 7.45 (m, 5H, Fmoc-H1, Fmoc-H8, Bn-H), 7.42 – 7.27 (m, 5H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7, Bn-H), 6.02 – 5.97 (m, 1H, Fmoc-NH), 5.60 – 5.48 (m, 1H, Bnz-CH), 5.40 – 5.32 (m, 1H, Gal-H4), 5.11 – 4.98 (m, 2H, Gal-H2, Gal-H3), 4.96 – 4.82 (m, 1H, GalNAc-H1), 4.74 (d, 1H,  $^3J_{\text{Gal-H1/Gal-H2}} = 7.6$  Hz, Gal-H1), 4.63 (d, 1H,  $^3J_{\text{Gal-H1/Gal-H2}} = 7.6$  Hz, Gal-H1), 4.57 – 4.28 (m, 6H, GalNAc-H2, hAc-H2a,b, Fmoc-CH<sub>2</sub>, GalNAc-H4), 4.24 – 3.72 (m, 9H, Fmoc-H9, H2a,b, Gal-H6a,b, GalNAc-H6a,b, GalNAc-H5, GalNAc-H3), 3.47 – 3.25 (m, 4H, H3a,b, H4a,b), 2.11, 2.05, 2.03, 2.00, 2.00, 1.97, 1.95, 1.94 (9 x s, 15H, CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.48 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz, HSQC, HMBC,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  = 172.0, 171.5, 171.4, 171.4, 170.7, 170.5, 170.4, 170.2, 169.2, 168.6, 162.8 (C=O-Ac, C=O-AcNH, C1, hAc-C1, Rotamere), 156.9, 156.8 (C=O, Urethan), 144.0, 143.9 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.4 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 137.5 (C<sup>q</sup>-Bn), 129.5, 129.3, 128.6, 128.3, 127.9, 127.4, 127.3, 126.5, 126.3, 126.2 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C6, Fmoc-C7, Bn-C), 125.5, 125.4, 124.8 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 120.1 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 102.3, 102.2 (Gal-C1), 101.3 (Bnz-CH), 100.5, 99.9 (GalNAc-C1), 83.8, 82.7 (*t*Bu-C<sup>q</sup>), 76.9, 76.7 (GalNAc-C3), 76.0 (GalNAc-C4), 71.1, 70.6 (Gal-C3), 69.5, 69.4 (GalNAc-C6), 69.2 (Gal-C5), 69.1 (Gal-C2), 67.2 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 67.2 (Gal-C4), 67.0, 66.0 (hAc-C2), 63.7, 63.64 (GalNAc-C5), 61.7 (Gal-C6), 49.9 (C2), 48.3 (GalNAc-C2), 48.2 (C3), 47.3 (Fmoc-C9), 39.3 (C4), 28.2 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 23.6, 23.6, 21.2, 21.1, 20.9, 20.9, 20.7 (CH<sub>3</sub>-Ac, CH<sub>3</sub>-AcNH) ppm.

### 5.6.26 *N*-((2-Hydroxyacetyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galctopyranosyl))-*N*-(*N'*-(9*H*-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-glycin (75a)

Fmoc-NEt-(Ac<sub>3</sub>GalNAc-*O*-hAc)-Gly-OH

Eine Lösung von 156 mg (0.199 mmol) Fmoc-NEt-(Ac<sub>3</sub>GalNAc-*O*-hAc)-Gly-*Ot*Bu **75** in 11 mL TFA/H<sub>2</sub>O (*v/v* = 10:1) 3 h lang gerührt. Die Lösung wurde mit 20 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde dreimal mit je 15 mL Toluol kodestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 122 mg (0.168 mmol, 85%) eines blass braunen Farbstoffs.



$\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_{11}$ ,  $M = 727.71 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [727.2589].

$[\alpha]_D^{20}$  (*c* = 0.50, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = +44.8

HR-ESI-MS:  $C_{35}H_{41}N_3O_{14}Na$ ,  $[M+Na]^+$ , ber. 750.2481, gef. 750.2480

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  = 7.77 – 7.69 (m, 2H, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.56 (d, 2H,  $^3J_{Fmoc-H1/Fmoc-H8}$  = 7.5 Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.42 – 7.26 (m, 4H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7), 5.41 – 5.29 (m, 1H, GalNAc-H4), 5.20 – 5.13 (m, 1H, GalNAc-H3), 4.89 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H1/GalNAc-H2}$  = 3.5 Hz, GalNAc-H1), 4.73 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H1/GalNAc-H2}$  = 2.6 Hz, GalNAc-H2), 4.53 – 4.48 (m, 1H, GalNAc-H2), 4.42 – 4.26 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.25 – 4.08 (m, 1H, Fmoc-H9), 4.08 – 3.99 (m, 1H, GalNAc-H5), 3.98 – 3.88 (m, 2H, GalNAc-H6a,b), 3.83 – 3.74 (m, 2H, H2a,b), 3.67 – 3.40 (m, 2H, H3a,b), 3.40 – 3.22 (m, 2H, H4a,b), 2.18 – 2.07 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 2.05 – 1.90 (m, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>-Ac) ppm.

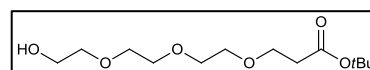
$^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  = 172.8, 171.7, 170.8, 170.6, 170.5, 170.3 (3 x C=O-Ac, C=O-AcHN, COOH, C=O), 157.0, 156.9 (C=O, Urethan), 143.9, 143.8, 143.7 (Fmoc-C1a, Fmoc-C8a), 141.6, 141.4, 141.4 (Fmoc-C4a, Fmoc-C5a), 128.0, 127.9, 127.2 (Fmoc-C2, Fmoc-C3, Fmoc-C6, Fmoc-C7), 125.1 (Fmoc-C1, Fmoc-C8), 120.1 (Fmoc-C4, Fmoc-C5), 99.5, 99.0 (GalNAc-C1), 68.5, 68.4 (GalNAc-C3), 67.4, 67.3, 67.0 (GalNAc-C4, GalNAc-C5, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 65.6 (hAc-C2), 61.9, 61.8, 61.7 (GalNAc-C6), 53.6, 49.1, 48.1, 48.0 (C2), 47.8 (GalNAc-C2), 47.3, 47.2, 47.1 (Fmoc-C9), 39.2, 39.0 (C4), 23.0, 22.7, 20.8, 20.8, 20.7 (CH<sub>3</sub>-Ac) ppm.

## 5.7 Synthesen zu 4.6 – Synthese eines nicht-immunogenen Linkers

### 5.7.1 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert.*-butylester <sup>[242]</sup> (**85**)

HO-TEG-COO*t*Bu

Zu einer Lösung von 25.6 mL (188 mmol, 3.0 Äq.) wasserfreiem Triethylenglycol (**83**) in 100 mL absolutem



THF wurden unter Argonatmosphäre 40 mg (0.90 mmol, 0.01 Äq.) Natrium gegeben. Nachdem das Natrium vollständig gelöst war, wurden 9.6 mL (66 mmol, 1.0 Äq.) Acrylsäure-*tert.*-butylester (**84**) zur klaren Lösung gegeben und die Lösung wurde für 21 h gerührt. Durch Zugabe von 1.6 mL 1 M Salzsäure wurde die Reaktionslösung neutralisiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde mit 70 mL gesättigter Natriumchloridlösung versetzt und dreimal mit je 60 mL Ethylacetat extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereint, mit 40 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt. Ausbeute 15.0 g (53.9 mmol, 82%) eines farblosen Öls.

$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_6$ ,  $M = 278.34 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [278.1729].

$R_f(\text{EtOAc}) = 0.31$ .

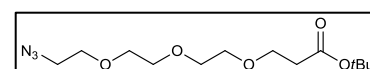
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), <sup>[242]</sup>  $\delta = 3.73 - 3.66$  (m, 4H, H<sub>3a,b</sub>, H<sub>12a,b</sub>),  $3.66 - 3.53$  (m, 10H, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>11(a,b)</sub>), 2.74 (s, 1H, OH), 2.47 (t, 2H,  $^3J_{\text{H}_{2a,b}/\text{H}_{3a,b}} = 6.8$  Hz, H<sub>2a,b</sub>), 1.41 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

Für weitere analytische Daten siehe Literatur. <sup>[322]</sup>

### 5.7.2 12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert.*-butylester <sup>[44]</sup> (**87**)

N<sub>3</sub>-TEG- COO*t*Bu

Eine Lösung von 15.0 g (53.9 mmol, 1.0 Äq.) Alkohol **85** in 20 mL absolutem Dichlormethan wurde mit 18.0 mL



(130 mmol, 2.4 Äq.) Triethylamin versetzt. Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung wurden 8.31 mL (110 mmol, 2.0 Äq.) Mesylchlorid getropft. Das Gemisch wurde anschließend 3 h lang bei dieser Temperatur gerührt. Das entstandene Triethylamin-Hydrochlorid wurde durch Hyflo® abfiltriert und mit 50 mL Dichlormethan gespült. Nachdem die organische

Phase zweimal mit Eiswasser und einmal mit 20 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen wurde, wurde die organische Phase mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL DMF aufgenommen, mit 21.5 g (329 mmol, 6.1 Äq.) Natriumazid versetzt und 15 h bei 60 °C gerührt. Das DMF wurde im Anschluss im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde viermal mit Diethylether extrahiert und die organische Phase erneut mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (cHex:EtOAc = 3:1). Ausbeute :13.3 g (43.8 mmol, 81%) eines farblosen Öls.

$$\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5, M = 303.35 \frac{\text{g}}{\text{mol}}, [303.1794]$$

$$R_f(\text{cHex:EtOAc} = 3:1) = 0.33.$$

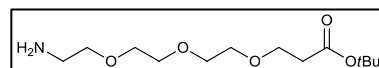
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),<sup>[44]</sup>  $\delta = 3.73 - 3.58$  (m, 14H, H3, H5, H6, H8, H9, H11, H12 (a,b)), 2.04 (t, 2H,  $^3J_{\text{H2a,b/H3a,b}} = 6.4$  Hz, H2a,b), 1.43 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ -*t*Bu) ppm.

Für weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[323-324]</sup>

### 5.7.3 12-Amino-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert.*-butylester<sup>[44]</sup>(88)

$\text{H}_2\text{N-TEG-COO}t\text{Bu}$

Eine Suspension von 9.90 g (0.25 mol) Ni-Al-Legierung in 250 mL Wasser wurde unter Erwärmen solange mit festem Natriumhydroxid versetzt, bis kein Schäumen mehr zu beobachten war. Nach 1 h Reaktionsdauer wurde die überstehende Lösung abdekantiert und das Raney-Nickel wurde mit Wasser zunächst neutral gewaschen und anschließend mit Isopropanol vom Wasser befreit.<sup>j</sup> Zum in Isopropanol suspendierten Katalysator wurden 13.3 g (43.8 mmol,) Azid **87** gelöst in 80 mL Isopropanol, gegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter Wasserstoffatmosphäre bis zum vollständigen Umsatz (DC-Kontrolle) gerührt. Der Katalysator wurde durch Hyflo® abfiltriert und der Filtrerrückstand mit 50 mL Isopropanol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt. Ausbeute: 12.0 g (35.0 mmol, 81%) eines gelblichen Öls.



$$\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{NO}_5, M = 277.36 \frac{\text{g}}{\text{mol}}, [277.1889].$$

<sup>j</sup> Anstelle des unmittelbar vor der Reaktion hergestellten Katalysators kann auch kommerziell erhältliches Raney-Nickel in wässriger Suspension verwendet werden.

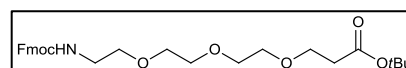
$$R_f(\text{cHex:EtOAc} = 3:1) = 0.33$$

Für weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[190]</sup>

### 5.7.4 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10- trioxado-decansäure-*tert*.-butylester<sup>[190]</sup> (89)

FmocNH-TEG- COOtBu

Zu einer Lösung von 12.0 g (35.0 mmol, 1.0 Äq) Amin **88** in 300 mL einer Mischung aus Aceton und Wasser



(*v/v* = 1:1) wurden 4.01 g (48.0 mmol, 1.4 Äq.) Natriumhydrogencarbonat gegeben. Unter Rühren wurden anschließend portionsweise 18.0 g (53.0 mmol, 1.5 Äq) Fmoc-OSu in die Lösung eingetragen und 60 h zur Vervollständigung der Reaktion 60 h gerührt (DC-Kontrolle). Die Lösung wurde mit 10 mL halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 6 angesäuert. Dabei schied sich ein gelbes Öl als Produkt ab. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde viermal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit 200 mL 1 M Salzsäure und 200 mL Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (cHex:EtOAc = 2:1 → 1:1 → 1:2). Ausbeute: 12.0 g (25.0 mmol, 81%) eines gelblichen Öls.

$$\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{NO}_7, M = 499.60 \frac{\text{g}}{\text{mol}}, [499.2570].$$

$$R_f(\text{cHex:EtOAc} = 2:1) = 0.34.$$

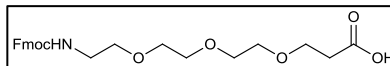
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),<sup>[190]</sup>  $\delta$  = 7.74 (d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>Fmoc-H4/Fmoc-H3</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>Fmoc-H5/Fmoc-H6</sub> = 6.8 Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.58 (d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>Fmoc-H1/Fmoc-H2</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>Fmoc-H8/Fmoc-H7</sub> = 7.3 Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.46 – 7.15 (m, 4H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7), 4.38 (d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>Fmoc-CH2/Fmoc-H9</sub> = 7.8 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.20 (t, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>Fmoc-H9/Fmoc-CH2</sub>, Fmoc-H9), 3.79 – 3.47 (m, 12H, H3, H5, H6, H8, H9, H11 (a,b)), 3.38 (t, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>H12a,b/H11a,b</sub> = 5.4 Hz, H12a,b), 2.46 (t, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>H2a,b/H3a,b</sub> = 6.4 Hz, H2a,b), 1.41 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu) ppm.

Für weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[190]</sup>

### 5.7.5 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10- trioxado-decansäure<sup>[190]</sup> (**89a**)

FmocNH-TEG-COOH

Es wurden 12.0 g (25.0 mmol) des Linkers **89** in einer Mischung aus 40 mL Trifluoressigsäure und 5 mL Wasser 3 h lang gerührt. Die Reaktion wurde mit 30 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit je 20 mL Toluol kdestilliert. Das Rohprodukt wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH/AcOH = 19:1:0.5). Ausbeute: 7.41 g (16.8 mmol, 67%) eines bräunlichen Öls.



C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>7</sub>, M = 443.49  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [443.1944].

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH/AcOH = 19:1:0.5) = 0.34.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>[190]</sup>,  $\delta$  = 7.77 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H4/Fmoc-H3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H5/Fmoc-H6</sub> = 7.9 Hz, Fmoc-H4, Fmoc-H5), 7.60 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H1/Fmoc-H2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H8/Fmoc-H7</sub> = 7.4 Hz, Fmoc-H1, Fmoc-H8), 7.42 – 7.14 (m, 4H, Fmoc-H2, Fmoc-H3, Fmoc-H6, Fmoc-H7), 4.38 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-CH2/Fmoc-H9</sub> = 6.8 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.20 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Fmoc-H9/Fmoc-CH2</sub> = 6.8 Hz, Fmoc-H9), 3.69 – 3.49 (m, 12H, H3, H5, H6, H8, H9, H11 (a,b)), 3.38 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H12a,b/H11a,b</sub> = 5.4 Hz, H12a,b), 2.60 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H2a,b/H3a,b</sub> = 6.7 Hz, H2a,b) ppm.

Für weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[190]</sup>



## 5.8 Synthesen zu 4.7 – Peptidsynthesen

### 5.8.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Peptidsynthese am ABI 433A (AAV1)

Peptide wurden am ABI 433A der Fa. *Applied Biosystems*, Foster City, nach dem Standardprogram Fastmoc 0.1 mmol ausgeführt. Als Harz diente mit Fmoc-Prolin vorbeladenes TentaGel-S-Harz der Fa. *Rapp-Polymere*, Tübingen. Für die Kupplungsreaktionen wurden die Aminosäurederivate Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH und Fmoc-Val-OH verwendet. In jedem Kupplungsschritt wurde die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung des Harzes mit 20% Piperidin in NMP für mindestens 3 x 2.5 min gespalten. Die nachfolgende Kupplung der Aminosäure (10 Äq. bezogen auf das Harz) erfolgte mit HBTU (1 Äq. bezogen auf die Aminosäure), HOBt (1 Äq. bezogen auf die Aminosäure) und DIPEA (2 Äq. bezogen auf die Aminosäure, 2 M in DMF) unter 20 – 30 min vortexen. Nach jedem Kupplungsschritt wurden Aminogruppen, die nicht reagierten, mit einer Mischung aus Essigsäureanhydrid (0.5 M), DIPEA (0.125 M) und HOBt (0.015 M) in NMP gecappt. Andere Derivate werden bei den entsprechenden Peptiden behandelt. Die Ansatzgröße betrug 0.1 mmol.

### 5.8.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Peptidsynthese an der Liberty1 (AAV2)

Für Peptide, die an der Liberty1 der Fa. *CEM*, Matthews, synthetisiert wurden, fanden mit Fmoc-Alanin beladene low-load Wang-Harze der Fa. *Novabiochem*, Darmstadt, ihren Einsatz. Für die Kupplungsreaktionen wurden die Aminosäurederivate Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH und Fmoc-Val-OH verwendet. In jedem Kupplungsschritt wurde die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung des Harzes mit 20% Piperidin in DMF für 3 min bei 80 °C (30 W) gespalten. Die Kupplung der nachfolgenden Aminosäure (5 Äq. bezogen auf das Harz) erfolgte mit HBTU (0.5 Äq. bezogen auf die Aminosäure), HOBt (1 Äq. bezogen auf die Aminosäure) und DIPEA (2 Äq. bezogen auf die Aminosäure, 2 M in DMF) innerhalb von 8 min bei 80 °C (23 W). Fmoc-Arg(Pbf)-OH wurde in einem Doppelkupplungsschritt zunächst 30 min bei Raumtemperatur und anschließend 5 min bei 80 °C (23 W) gekuppelt. Fmoc-His(Trt)-OH wurde 6 min bei 80 °C (< 23 W) gekuppelt. Auf einen Capping-Schritt wurde verzichtet.

Andere Derivate werden bei den entsprechenden Peptiden behandelt. Die Ansatzgröße betrug 0.1 mmol.

### **5.8.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Spaltung des Peptids vom Harz (AAV3)**

#### **5.8.3.1 Trityl-Harze (AAV3a)**

Harze, die das Peptid über einen Trityl-Linker gebunden trugen, wurden in einen Glas-Merrifieldreaktor überführt und mit einer Emulsion aus 10.0 mL TFA, 1.0 mL Reinwasser und 1.0 mL TIPS 3 h lang geschüttelt. Das Harz wurde abfiltriert und der Filterkuchen wurde zweimal mit 5 – 10 mL TFA nachgespült. Die Suspension wurde mit 20.0 mL Toluol verdünnt und die TFA und das Toluol wurden im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde weitere dreimal mit je 20 – 30 mL Toluol kodestilliert.

#### **5.8.3.2 Wang-Harze (AAV3b)**

Harze, die das Peptid über einen Wang-Linker gebunden trugen, wurden in Glas-Merrifieldreaktor überführt und mit einer Lösung aus 10.0 mL TFA und 1.0 mL Reinwasser 2 h lang geschüttelt, bevor 1.0 mL TIPS zugegeben und die Suspension eine weitere Stunde geschüttelt wurde. Das Harz wurde abfiltriert und der Filterkuchen wurde zweimal mit 5 – 10 mL TFA nachgespült. Die Suspension wurde mit 20 mL Toluol verdünnt und die TFA und das Toluol wurden im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde weitere dreimal mit je 20 – 30 mL Toluol kodestilliert.

### **5.8.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift zum Ausfällen von Peptiden aus eiskaltem Ether (AAV4)**

Die aus Abschnitt 5.8.3 erhaltenen Rückstände wurden in 2 mL Methanol gelöst und in 43 mL eiskalten Diethylether langsam eingetropft. Die Suspension wurde 10 – 30 min lang zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Der Rückstand wurde solange erneut in 2 mL Methanol gelöst und in 43 mL eiskalten Diethylether eingetropft, bis der Rückstand farblos war.

### 5.8.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Lyophilisation von Peptiden (AAV5)

Aus Mischungen organischer Lösungsmittel mit Wasser z.B. aus HPLC-Läufen wurde zunächst das organische Lösungsmittel abdestilliert, bevor die Lösung in flüssigem Stickstoff unter Schwenken eingefroren wurde. Die Lyophilisation erfolgte an einem Gerät der Fa. *Martin Christ*, Osterode am Harz.

### 5.8.6 L-Prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (90)

Das Peptid **90** wurde nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV1, AAV3a und AAV5 dargestellt. Die Reinigung des Rohpeptids erfolgte durch RP-HPLC. Ausbeute: 63 mg (84  $\mu$ mol, 81%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

$C_{32}H_{52}N_{10}O_{11}$ ,  $M = 752.82 \frac{g}{mol}$ , [752.3817].

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $C_{32}H_{53}N_{10}O_{11}$ ,  $[M+H]^+$ , ber. 753.3890, gef. 753.3881.

$^1H$ -NMR (400 MHz, HSQC, COSY, NOESY, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  = 12.54 (bs, 1H, COOH), 9.51 (bs, 1H, COOH), 8.91 (d, 1H,  $^3J_{DNH/D\alpha} = 7.6$  Hz,  $D^{NH}$ ), 8.58 (bs, 1H, OH), 8.13 (d, 1H,  $^3J_{ANH/A\alpha} = 7.6$  Hz,  $A^{NH}$ ), 7.94 (d, 1H,  $^3J_{RNH/R\alpha} = 7.6$  Hz,  $R^{NH}$ ), 7.70 (pt, 2H,  $T^{NH}$ ,  $R^{\delta NH}$ ), 7.55 – 6.95 (m, 3-4H, Guanidin, OH), 4.88 (bs, 1H, OH), 4.69 (ddd, 1H,  $^3J_{D\alpha/D\beta a} = 5.0$  Hz,  $^3J_{D\alpha/DNH} = 8.2$  Hz,  $^3J_{D\alpha/D\beta b} = 13.1$  Hz,  $D^\alpha$ ), 4.52 – 4.41 (m, 2H,  $R^\alpha$  {4.49},  $A^\alpha$  {4.46}), 4.33 (dd, 1H,  $^3J_{P\alpha/P\beta a} = 4.5$  Hz,  $^3J_{P\alpha/P\beta b} = 8.6$  Hz,  $P_1^\alpha$ ), 4.23 – 4.14 (m, 3H,  $T^\alpha$  {4.16},  $P_2^\alpha$  {4.21},  $P_3^\alpha$  {4.18}), 4.01 – 3.93 (m, 1H,  $T^\beta$ ), 3.66 – 3.32 (m, 4H,  $P_1^{\delta a}$  {3.61},  $P_1^{\delta a}$  {3.57},  $P_2^{\delta b}$  {3.49},  $P_2^{\delta b}$  {3.47}), 3.28 – 3.17 (m, 2H,  $P_3^\delta$ ), 3.13 – 3.03 (m, 2H,  $R^\delta$ ), 2.77 (dd, 1H,  $^3J_{D\beta a/D\alpha} = 5.3$  Hz,  $^2J_{D\beta a/D\beta b} = 17.3$  Hz,  $D^{\beta a}$ ), 2.58 – 2.51 (m, 1H,  $D^{\beta b}$ ), 2.34 – 2.23 (m, 1H,  $P_3^{\beta a}$ ), 2.20 – 2.09 (m, 1H,  $P_2^{\beta a}$ ), 2.06 – 1.96 (m, 1H,  $P_1^{\beta a}$ ), 1.95 – 1.65 (m, 10H,  $R^{\beta a}$  {1.70},  $P_3^{\beta b}$  {1.88},  $P_2^{\beta b}$  {1.82},  $P_1^{\beta b}$  {1.77},  $P_1^\gamma$  {1.88},  $P_2^\gamma$  {1.86},  $P_3^\gamma$  {1.86}), 1.59 – 1.44 (m, 3H,  $R^{\beta b}$  {1.51},  $R^\gamma$  {1.51}), 1.18 (d, 3H,  $^3J_{A\beta/A\alpha} = 7.0$  Hz,  $A^\beta$ ), 1.01 (d, 3H,  $^3J_{T\beta/T\gamma} = 6.5$  Hz,  $T^\gamma$ ) ppm.

$^{13}C$ -NMR (100 MHz, HSQC, DEPT, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  = 173.7, 172.0, 171.4, 170.9, 170.5, 170.0, 169.9, 168.7 (C=O-NH, COOH P, COOH D), 157.3 (R, Guanidin), 67.1 ( $T^\beta$ ), 59.5, 59.2, 58.9 ( $P_{1-3}^\alpha$ ), 58.3 ( $T^\alpha$ ), 50.5 (Ra), 50.3 ( $D^\alpha$ ), 47.2 ( $A^\alpha$ ), 46.7, 46.5, 46.2 ( $P_{1-3}^\delta$ ), 41.0 ( $R^\delta$ ), 36.2 ( $D^\beta$ ), 30.0, 29.5, 29.0 ( $P_{1-3}^\beta$ ), 28.77 ( $R^\beta$ ), 25.0, 24.9, 23.8 ( $P_{1-3}^\gamma$ ), 24.8 ( $R^\gamma$ ), 20.1 ( $T^\gamma$ ), 17.1 ( $A^\beta$ ) ppm.

### 5.8.7 *L*-Prolyl-*L*-aspartyl-*L*-homo- $\beta^3$ -homo-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolin (**91**)

Das Peptid **91** wurde nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV1, AAV3a und AAV5 dargestellt. Die Kupplung des Aminosäurederivats Fmoc-hThr(*t*Bu)-OH **31a** erfolgte mit HATU, HOAt und NMM als Base. Die Kupplungszeit wurde für **31a** auf 8 h verlängert. Die Reinigung des Rohpeptids erfolgte durch RP-HPLC. Ausbeute: 54 mg (70  $\mu$ mol, 69%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

$C_{33}H_{54}N_{10}O_{11}$ ,  $M = 766.84 \frac{g}{mol}$ , [766.3974].

ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $C_{34}H_{55}N_{10}O_{11}$ ,  $[M+H]^+$ , ber. 767.4031, gef. 767.40.

$^1H$ -NMR (400 MHz, HSQC, COSY, NOESY, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  = 12.51 (bs, 1H, COOH), 8.81 (d, 1H,  $^3J_{DNH/D\alpha} = 8.2$  Hz,  $D^{NH}$ ), 8.06 (d, 1H,  $^3J_{RNH/R\alpha} = 7.4$  Hz,  $R^{NH}$ ), 8.05 (d, 1H,  $^3J_{ANH/A\alpha} = 7.6$  Hz,  $A^{NH}$ ), 7.67 (t, 1H,  $^3J_{RNH(Guanidin)/R\delta} = 5.4$  Hz,  $R^{NH, Guanidin}$ ), 7.54 (d, 1H,  $^3J_{hTNH/hT\beta} = 10.1$  Hz,  $hT^{NH}$ ), 7.48 – 6.85 (m, 4H, Guanidin, OH), 4.70 (d, 1H,  $^3J = 4.2$  Hz, NH), 4.62 – 4.54 (m, 1H,  $D^\alpha$ ), 4.51 – 4.41 (m, 2H,  $R^\alpha$  {4.47},  $A^\alpha$  {4.44}), 4.36 – 4.30 (m, 1H,  $P_3^\alpha$ ), 4.20 (dd, 1H,  $^3J_{P\alpha/P\beta a} = 4.6$  Hz,  $^3J_{P\alpha/P\beta b} = 8.6$  Hz,  $P_2^\alpha$ ), 4.18 – 4.13 (m, 1H,  $P_1^\alpha$ ), 3.97 (dd, 1H,  $^3J_{hT\beta/T\gamma} = 3.9$  Hz,  $^3J_{hT\beta/T\alpha} = 7.3$  Hz,  $hT^\beta$ ), 3.69 – 3.44 (m, 5H,  $hT^\gamma$  {3.63},  $P_3^\delta$  {3.59},  $P_2^\delta$  {3.50}), 3.26 – 3.13 (m, 2H,  $P_1^\delta$ ), 3.12 – 3.00 (m, 2H,  $R^\delta$ ), 2.68 (dd, 1H,  $^3J_{D\beta a/D\alpha} = 4.8$  Hz,  $^2J_{D\beta a/D\beta b} = 17.0$  Hz,  $D^{\beta a}$ ), 2.50 ( $D^{\beta b}$  unter DMSO), 2.47 – 2.41 (m, 1H,  $hT^{\alpha a}$ ), 2.30 – 2.20 (m, 1H,  $P_3^{\beta a}$ ), 2.18 – 2.06 (m, 2H,  $hT^{\alpha b}$ ,  $P_2^{\beta a}$ ), 2.04 – 1.97 (m, 1H,  $P_1^{\beta a}$ ), 1.93 – 1.74 (m, 9H,  $P_1^{\beta b}$  {1.77},  $P_2^{\beta b}$  {1.84},  $P_3^{\beta b}$  {1.85},  $P_1^\gamma$  {1.84},  $P_2^{\gamma a}$  {1.89},  $P_3^{\gamma a}$  {1.89},  $R^\gamma$  {1.85}), 1.69–1.58 (m, 1H,  $R^{\beta a}$ ), 1.55–1.43 (m, 3H,  $P_{2-3}^{\gamma b}$  {1.50, 1.48},  $R^{\beta b}$  {1.48}), 1.18 (d, 3H,  $^3J_{A\beta/A\alpha} = 7.0$  Hz,  $A^\beta$ ), 0.90 (d, 3H,  $^3J_{T\delta/T\gamma} = 6.4$  Hz,  $hT^\delta$ ) ppm.

$^{13}C$ -NMR (100 MHz, HSQC, DEPT, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  = 173.3, 171.6, 171.0, 170.4, 170.2, 169.8, 169.5, 168.2 (C=O-NH, COOH P, COOH D), 156.9 (C-Guanidin), 66.4 ( $hT^\gamma$ ), 59.1, 58.8, 58.5 ( $P_{1-3}^\alpha$ ), 51.1 ( $hT^\beta$ ), 50.0 ( $R^\alpha$ ), 49.8 ( $D^\alpha$ ), 46.9 ( $A^\alpha$ ), 46.3, 46.1, 45.8 ( $P_{1-3}^\delta$ ), 40.6 ( $R^\delta$ ), 36.5 ( $hT^\alpha$ ), 36.0 ( $D^\beta$ ), 29.6, 29.0, 28.6 ( $P_{1-3}^\beta$ ), 28.4 ( $R^\beta$ ), 24.6, 24.5, 24.4 ( $P_{1-3}^\gamma$ ), 23.4 ( $R^\gamma$ ), 19.6 ( $hT^\delta$ ), 16.7 ( $A^\beta$ ) ppm.

**5.8.8 Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-histidyl-*L*-glycyl-*L*-valyl-*O*-( $\alpha$ -3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-galactopyranosyl)-homo- $\beta^3$ -threonyl-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolin (92)**

Es fanden die allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV1 und AAV3a Anwendung. Die Lösung wurde dreimal mit 10 mL Toluol kodestilliert und auf ein Minimum reduziert. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Reinigung des Rohpeptids erfolgte durch RP-HPLC (5% B – 50' – 100% B). Ausbeute: 88 mg (36  $\mu$ mol, 36%) eines farblos amorphem Feststoffs.

$C_{104}H_{164}N_{27}O_{37}$ , 2432.57  $\frac{g}{mol}$ , [2431.1629].

$[\alpha]_D^{23}$  ( $c = 1.00$ ,  $H_2O$ ) = -79.9.

HR-ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $C_{98}H_{164}N_{27}O_{37}$ ,  $[M+2H]^+$ , ber. 1217.0932, gef. 1217.0941.

$^1H$ -NMR (400 MHz, COSY, HSQC, TOCSY,  $D_2O$ ),  $\delta$  = 8.50 (m, 1 H,  $H^E$ ), 7.19 (m, 1H,  $H^D$ ), 5.31 – 5.28 (m, 1H, GalNAc-H4), 5.08 (dd, 1H,  $^3J_{GalNAc-H3/GalNAc-H4} = 3.1$  Hz,  $^3J_{GalNAc-H3/GalNAc-H2} = 11.7$  Hz, GalNAc-H3), 5.01 (d, 1H,  $^3J_{GalNAc-H1/GalNAc-H2} = 3.5$  Hz, GalNAc-H1), 4.64 – 4.54 (m, 2 H,  $D^a$  {4.61},  $H^a$  {4.57}), 4.54 – 4.37 (m, 5 H,  $R^a$  {4.52},  $A_2^a$  {4.47},  $A_3^a$  {4.46},  $A_4^a$  {4.45},  $S_1^a$  {4.39, t,  $^3J_{S1a/S1b} = 5.5$  Hz}), 4.36 – 4.20 (m, 10H,  $S_2^a$  {4.33},  $hT^b$  {4.27},  $A_1^a$  {4.29}, GalNAc-H5 {4.32},  $T_1^a$  {4.30},  $T_2^a$  {4.24},  $P_{1-4}^a$  {4.29} {4.28} {4.27} {4.24}), 4.19 (d, 1H,  $^3J_{V\alpha/V\beta} = 4.5$  Hz,  $V^a$ ), 4.15 – 3.89 (m, 6 H, GalNAc-H2 {4.12},  $T_1^b$ ,  $T_2^b$  {4.09} {4.07}, GalNAc-H6 {4.02},  $P_5^a$  {3.94}), 3.89-3.73 (m, 7H,  $G_1^{aa}$  {3.86},  $G_2^{aa}$  {3.83},  $G_1^{ab}$  {3.80},  $G_2^{ab}$  {3.77},  $hT^c$  {3.77},  $S_2^b$  {3.76}), 3.73 – 3.59 (m, 11H,  $P_{1-5}^{da}$  {3.67},  $S_1^b$  {3.65},  $2 \times CH_2$ -spacer {3.64} {3.62}), 3.59 – 3.28 (m, 13 H,  $2 \times CH_2$ -spacer {3.57},  $2 \times CH_2$ -spacer {3.54},  $P_{1-5}^{db}$  {3.52}), 3.18 (dd, 1H,  $^3J_{H\beta a/H\alpha} = 5.2$  Hz,  $^3J_{H\beta a/H\beta b} = 15.1$  Hz,  $H^{\beta a}$ ), 3.11 – 3.01 (m, 5H,  $CH_2$ -spacer {3.08},  $H^{\beta b}$  {3.07},  $R^d$  {3.07}), 2.84 (dd, 1H,  $^3J_{D\beta a/D\alpha} = 6.5$  Hz,  $^3J_{D\beta a/D\beta b} = 16.8$  Hz,  $D^{\beta a}$ ), 2.75 (dd, 1 H,  $^3J_{D\beta b/D\alpha} = 6.5$  Hz,  $^3J_{D\beta b/D\beta a} = 16.7$  Hz,  $D^{\beta b}$ ), 2.67 – 2.40 (m, 4H,  $CH_2$ -spacer {2.61} {2.55},  $hT^e$  {2.59} {2.46}), 2.23 – 2.05 (m, 8H,  $P_{1-5}^{Ba}$  {2.20} {2.17} {2.14},  $CH_3$ -Ac {2.07}), 2.01 – 1.66 (m, 29H,  $3 \times CH_3$ -Ac {1.94} {1.92} {1.89},  $P_{1-5}^{\gamma}$  {1.95-1.83},  $P_{1-5}^{\beta b}$  {1.92-1.71},  $V^b$  {1.86},  $R^{\beta a}$  {1.70}), 1.65 – 1.46 (m, 3H,  $R^{\beta b}$  {1.61},  $R^{\gamma}$  {1.54}), 1.28 – 1.17 (m, 12H,  $A_{1-4}^b$  {1.24} {1.20}), 1.07 – 1.01 (m, 9H,  $T_1^{\gamma}$  {1.07},  $hT^d$  {1.06},  $T_2^{\gamma}$  {1.04}), 0.76 (d, 3H,  $^3J_{V\gamma a/V\beta} = 5.8$  Hz,  $V^{\gamma a}$ ), 0.71 (d, 3H,  $^3J_{V\gamma b/V\beta} = 6.4$  Hz,  $V^{\gamma b}$ ) ppm.

$^{13}C$ -NMR (100 MHz, DEPT, HSQC,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm) = 176.6, 175.7, 174.9, 174.4, 174.3, 173.9, 173.4, 173.4, 173.1, 172.9, 172.8, 172.6, 172.4, 172.3, 171.9, 171.5, 171.3, 171.2, 171.1, 170.9, 170.8, 170.7 (C=O-NH, COOH P, COOH D), 156.7 (C-Guanidin), 133.5 ( $H^{C2}$ ), 128.4 ( $H^{C5}$ ), 117.3 ( $H^{C4}$ ), 98.2, 98.0 (GalNAc-C1), 77.2, 76.9 ( $hT^{\gamma}$ ), 69.6, 69.5,

69.4, 69.4 ( $4 \times \text{CH}_2\text{-Spacer}$ ), 68.4 (GalNAc-C3), 68.0 (GalNAc-C4), 67.0 ( $\text{T}_1^\beta$ ,  $\text{T}_2^\beta$ ), 66.7 (GalNAc-C5), 66.3, 66.0 ( $2 \times \text{CH}_2\text{-spacer}$ ), 62.5 (GalNAc-C6), 61.5, 61.1 ( $\text{S}_1^\beta$ ,  $\text{S}_2^\beta$ ), 60.8, 60.5, 60.0, 59.7, 58.7 ( $\text{P}_{1-5}^\alpha$ ), 59.6, 59.3 ( $\text{T}_1^\alpha$ ,  $\text{T}_2^\alpha$ ), 58.9 ( $\text{V}^\alpha$ ), 55.5, 54.9 ( $\text{S}_1^\alpha$ ,  $\text{S}_2^\alpha$ ), 52.24 ( $\text{H}^\alpha$ ), 51.1 ( $\text{R}^\alpha$ ), 50.5 ( $\text{hT}^\beta$ ), 50.0 ( $\text{D}^\alpha$ ), 49.6 (GalNAc-C2), 48.0, 47.9, 47.7, 47.4 ( $\text{P}_{1-5}^\delta$ ), 47.8, 47.8, 47.6, 47.6 ( $\text{A}_{1-4}^\alpha$ ), 42.4, 42.3 ( $\text{G}_1^\alpha$ ,  $\text{G}_2^\alpha$ ), 40.5 ( $\text{CH}_2\text{-spacer}$ ), 39.0 ( $\text{R}^\delta$ ), 36.2 ( $\text{hT}^\alpha$ ), 34.9 ( $\text{D}^\beta$ ), 34.0 ( $\text{CH}_2\text{-spacer}$ ), 29.9, 29.8 ( $\text{V}^\beta$ ), 29.6, 29.3, 29.2, 29.2, 28.1 ( $\text{P}_{1-5}^\beta$ ), 27.4 ( $\text{R}^\beta$ ), 26.2 ( $\text{H}^\beta$ ), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 ( $\text{P}_{1-5}^\gamma$ ), 23.9 ( $\text{R}^\gamma$ ), 21.8 ( $\text{CH}_3\text{-AcNH}$ ), 20.3, 20.0, 20.0 ( $3 \times \text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 18.8, 18.7 ( $\text{T}_1^\gamma$ ,  $\text{T}_2^\gamma$ ), 18.3, 17.7 ( $\text{V}^{\gamma\text{a}}$ ,  $\text{V}^{\gamma\text{b}}$ ), 16.6 ( $\text{hT}^\delta$ ), 16.2, 15.4, 15.2, 15.1 ( $\text{A}_{1-4}^\beta$ ) ppm.

### 5.8.9 Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-histidyl-*L*-glycyl-*L*-valyl-*O*-( $\alpha$ -2-acetamido-2-deoxy-galactopyranosyl)-homo- $\beta^3$ -threonyl-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolin (93)

Das Peptid **92** wurde in 10 mL Methanol (HPLC grade) gelöst und mit einer frisch hergestellten Lösung von Natriummethanolat in Methanol (0.5 g Natrium in 25 mL Methanol) vorsichtig bis zu einem pH-Wert von 9.5 erhöht. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt und mit Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in Wasser gelöst und lyophilisiert. Die Reinigung des Rohpeptids erfolgte durch RP-HPLC (5% B – 60' – 100% B). Ausbeute: 44 mg (19  $\mu\text{mol}$ , 50%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

$\text{C}_{98}\text{H}_{158}\text{N}_{27}\text{O}_{37}$ , 2306.46  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [2305.1312].

$[\alpha]_D^{23}$  ( $c = 1.00$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) = -83.7.

HR-ESI-MS (positiv,  $m/z$ ):  $\text{C}_{98}\text{H}_{160}\text{N}_{27}\text{O}_{37}$ ,  $[\text{M}+2\text{H}]^+$ , ber. 1154.0774, gef. 1154.0817.

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, COSY, HSQC,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta = 8.50$  (d, 1H,  $^4J_{\text{H}\delta/\text{H}\epsilon} = 1.6$  Hz,  $\text{H}^\epsilon$ ), 7.20 (d, 1H,  $^4J_{\text{H}\delta/\text{H}\epsilon} = 1.3$  Hz,  $\text{H}^\delta$ ), 4.89 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1}/\text{GalNAc-H2}} = 3.9$  Hz, GalNAc-H1), 4.62 (t, 1H,  $^3J_{\text{D}\alpha/\text{D}\beta} = 6.8$  Hz,  $\text{D}^\alpha$ ), 4.58 (dd, 1H,  $^3J_{\text{H}\alpha/\text{H}\beta\text{a}} = 6.7$  Hz,  $^3J_{\text{H}\alpha/\text{H}\beta\text{2}} = 8.6$  Hz,  $\text{H}^\alpha$ ), 4.55 – 4.49 (m, 1H,  $\text{R}^\alpha$ ), 4.50 – 4.43 (m, 3H,  $\text{A}_{1-3}^\alpha$  {4.48} {4.47} {4.45}), 4.40 (t, 1H,  $^3J_{\text{S1}\alpha/\text{S1}\beta} = 5.4$  Hz,  $\text{S}_1^\alpha$ ), 4.34 – 4.21 (m, 8H,  $\text{S}_2^\alpha$  {4.32},  $\text{P}_{1-5}^\alpha$  {4.29} {4.28} {4.28} {4.26} {4.26},  $\text{hT}^\beta$  {4.25},  $\text{T}_1^\alpha$  {4.24}), 4.20 (d, 1H,  $^3J_{\text{V}\alpha/\text{V}\beta} = 4.5$  Hz,  $\text{V}^\alpha$ ), 4.16 – 4.10 (m, 1 H,  $\text{A}_4^\alpha$ ), 4.11 – 4.05 (m, 2 H,  $\text{T}_1^\beta$ ,  $\text{T}_2^\beta$ ), 4.00 (dd, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H2}/\text{GalNAc-H1}} = 3.8$  Hz,  $^3J_{\text{GalNAc-H2}/\text{GalNAc-H3}} = 11.1$  Hz, GalNAc-H2), 3.95 – 3.89 (m, 2 H,  $\text{T}_2^\alpha$  {3.93}, GalNAc-H5 {3.89}), 3.89 – 3.82 (m, 4H,  $\text{G}_1^{\alpha\text{a}}$  {3.87},  $\text{G}_1^{\alpha\text{b}}$  {3.84},  $\text{G}_2^{\alpha\text{a}}$  {3.84}, GalNAc-H4 {3.84}), 3.82 – 3.74 (m, 3 H,



GalNAc-H3 {3.80}, G<sub>2</sub><sup>ab</sup> {3.80}, S<sub>1</sub><sup>ba</sup> {3.79}), 3.77-3.74 (m, 1 H, S<sub>1</sub><sup>bb</sup>), 3.74 – 3.61 (m, 12H, hT<sup>γ</sup> {3.72}, P<sub>1-5</sub><sup>da</sup> {3.70} {3.68} {3.68} {3.68} {3.67}, GalNAc-H6 {3.65}, 2 x CH<sub>2</sub>-spacer {3.65} {3.62}), 3.61-3.31 (m, 15H, S<sub>2</sub><sup>β</sup> {3.59}, 4 x CH<sub>2</sub>-spacer {3.58}, 4 x CH<sub>2</sub>-spacer {3.54}, P<sub>1-5</sub><sup>db</sup> {3.58-3.48}), 3.19 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Hβa/Hα</sub> = 5.2 Hz, <sup>2</sup>J<sub>Hβa/Hβb</sub> = 15.0 Hz, H<sup>ba</sup>), 3.11 – 3.02 (m, 5H, CH<sub>2</sub>-spacer {3.09}, R<sup>δ</sup> {3.07}, H<sup>bb</sup> {3.07}), 2.85 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Dβa/Dα</sub> = 6.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Dβa/Dβb</sub> = 17.4 Hz, D<sup>ba</sup>), 2.76 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>Dβb/Dα</sub> = 6.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>Dβb/Dβa</sub> = 17.0 Hz, D<sup>bb</sup>), 2.69 – 2.38 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-spacer {2.62}, hT<sup>αa</sup> {2.57}, CH<sub>2</sub>-spacer {2.55}, hT<sup>ab</sup> {2.43}), 2.26 – 2.07 (m, 5H, P<sub>1-5</sub><sup>ba</sup> {2.20}, {2.18}, {2.17}, {2.16}, {2.14}), 2.00 – 1.48 (m, 23H, P<sub>1-5</sub><sup>γ</sup> {1.98-1.80}, P<sub>1-5</sub><sup>bb</sup> {1.92-1.70}, CH<sub>3</sub>-AcNH {1.93}, V<sup>β</sup> {1.85}, R<sup>ba</sup> {1.71}, R<sup>bb</sup> {1.61}, R<sup>γ</sup> {1.54}), 1.29 – 1.18 (m, 12H, A<sub>1-4</sub><sup>β</sup> {1.26}, {1.24}, {1.21}, {1.21}), 1.10 – 1.02 (m, 9H, T<sub>1</sub><sup>γ</sup>, T<sub>2</sub><sup>γ</sup>, hT<sup>δ</sup> {1.06}, {1.04}, {1.04}), 0.76 (d, 3H, <sup>3</sup>J<sub>Vγa/Vβ</sub> = 6.7 Hz, V<sup>γa</sup>), 0.72 (d, 3H, <sup>3</sup>J<sub>Vγb/Vβ</sub> = 6.7 Hz, V<sup>γb</sup>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DEPT, HSQC, D<sub>2</sub>O), δ = 175.9, 174.9, 174.4, 174.4, 173.9, 173.5, 173.5, 173.1, 172.9, 172.8, 172.6, 172.5, 172.4, 172.4, 172.0, 171.5, 171.3, 171.2, 171.1, 170.9, 170.8, (C=O-NH, COOH P, COOH D), 156.7 (C-Guanidin), 133.4 (H<sup>C2</sup>), 128.4 (H<sup>C5</sup>), 117.3 (H<sup>C4</sup>), 98.0 (GalNAc-C1), 76.3 (hT<sup>γ</sup>), 69.6, 69.5, 69.5, 69.4 (4 × CH<sub>2</sub>-Spacer), 71.3 (GalNAc-C5), 68.5 (GalNAc-C3), 67.4 (GalNAc-C4), 67.0 (T<sub>1-2</sub><sup>β</sup>), 66.3, 66.0 (2 x CH<sub>2</sub>-spacer), 61.5 (GalNAc-C6), 61.2, 61.1 (S<sub>1</sub><sup>β</sup>, S<sub>2</sub><sup>β</sup>), 60.8, 60.5, 60.0, 59.7, 58.7 (P<sub>1-5</sub><sup>α</sup>), 59.6, 59.3 (T<sub>1</sub><sup>α</sup>, T<sub>2</sub><sup>α</sup>), 58.9 (V<sup>α</sup>), 55.5 (S<sub>2</sub><sup>α</sup>), 54.9 (S<sub>1</sub><sup>α</sup>), 52.3 (H<sup>α</sup>), 51.1 (R<sup>α</sup>), 50.5 (hT<sup>β</sup>), 50.1 (D<sup>α</sup>), 50.0 (GalNAc-C2), 49.6 (A<sub>4</sub><sup>α</sup>), 48.0, 47.9, 47.7, 47.4 (P<sub>1-5</sub><sup>δ</sup>), 47.8, 47.6, 47.6 (A<sub>1</sub><sup>α</sup>, A<sub>2</sub><sup>α</sup>, A<sub>3</sub><sup>α</sup>), 42.4, 42.3 (G<sub>1</sub><sup>α</sup>, G<sub>2</sub><sup>α</sup>), 40.5 (CH<sub>2</sub>-Spacer), 39.0 (R<sup>δ</sup>), 36.1 (hT<sup>α</sup>), 35.0 (D<sup>β</sup>), 34.0 (CH<sub>2</sub>-Spacer), 29.9 (V<sup>β</sup>), 29.6, 29.3, 29.2, 29.1, 28.7 (P<sub>1-5</sub><sup>β</sup>), 27.4 (R<sup>β</sup>), 26.2 (H<sup>β</sup>), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 (P<sub>1-5</sub><sup>γ</sup>), 23.9 (R<sup>γ</sup>), 21.9 (CH<sub>3</sub>-AcNH), 18.8, 18.7 (T<sub>1</sub><sup>γ</sup>, T<sub>2</sub><sup>γ</sup>), 18.3, 17.7 (V<sup>γa</sup>, V<sup>γb</sup>), 16.6 (hT<sup>δ</sup>), 16.2, 15.4, 15.1, 15.0 (A<sub>1-4</sub><sup>β</sup>) ppm.

#### 5.8.10 *L*-Prolyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-histidyl-*L*-glycyl-*L*-valyl-*L*-threonyl-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanin (94)

Es fanden die allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV2, AAV3b, AAV4 und AAV5 Anwendung. Die Reinigung des Rohpeptids erfolgte durch RP-HPLC (5% B – 20' – 40% B). Ausbeute: 97 mg (51 μmol, 51%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

C<sub>80</sub>H<sub>127</sub>N<sub>25</sub>O<sub>28</sub>, 1887.02  $\frac{g}{mol}$ , [1885.9282].

Analytische RP-HPLC: R<sub>t</sub> (5% B – 40' – 40% B) = 14.2 min.

[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> (c = 1.00, H<sub>2</sub>O) = -112.6.

HR-ESI-MS (positiv, m/z)  $C_{80}H_{130}N_{25}O_{28}$ ,  $[M+3H]^{3+}$ , ber. 629.6506, gef. 629.6502,  $C_{80}H_{129}N_{25}O_{28}$ ,  $[M+2H]^{2+}$ , ber. 943.9720, gef. 943.9714.

$^1H$ -NMR (600 MHz, HSQC, HMBC, COSY, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  = 9.59 (s, 1H, COOH), 8.94 (s, 1H,  $H^e$ ), 8.51 – 8.36 (m, 4H), 8.32 – 8.19 (m, 4H,  $G_1^{NH}$  {8.28},  $G_2^{NH}$  {8.28},  $A_1^{NH}$  {8.23},  $A_3^{NH}$  {8.23}), 8.13 – 8.07 (m, 2H,  $R^{NH}$  {8.10},  $A_2^{NH}$  {8.09}), 8.07 – 8.01 (m, 1H,  $T_2^{NH}$ ), 7.97 – 7.91 (m, 2H,  $D^{NH}$ ,  $A_4^{NH}$ ), 7.90 – 7.85 (m, 1H,  $V^{NH}$ ), 7.82 – 7.75 (m, 2H,  $S_2^{NH}$  {7.80},  $S_1^{NH}$  {7.79}), 7.70 (d, 1H,  $^3J_{TNH/T\alpha}$  = 8.5 Hz,  $T_1^{NH}$ ), 7.67 – 7.61 (m, 1H), 7.43 – 7.30 (m, 3H,  $H^d$ ,  $T_3^{NH}$  {7.33}), 4.61 – 4.44 (m, 7H,  $R^a$  {4.58},  $A_1^a$  {4.54},  $P_{1a}$  {4.53},  $D^a$  {4.49},  $T_1^a$  {4.46},  $A_2^a$  {4.46}), 4.41 – 4.24 (m, 7H,  $P_2^a$  {4.40},  $S_1^a$  {4.37},  $P_3^a$  {4.32},  $S_2^a$  {4.30},  $V^a$  {4.30},  $T_2^a$  {4.30},  $P_4^a$  {4.27}), 4.23 – 4.16 (m, 3H,  $T^a$  {4.21},  $A_3^a$  {4.19},  $A_4^a$  {4.19}), 4.09 – 4.04 (m, 1H,  $T_1^b$ ), 4.04 – 3.83 (m, 4H,  $T_2^b$  {3.98},  $T_3^b$  {3.96},  $H^a$  {3.94},  $G_1^{aa}$  {3.88}), 3.74 – 3.69 (m, 3H,  $G_1^{ab}$ ,  $G_2^a$ ), 3.69 – 3.30 (m, 12H,  $S_{1-2}^b$  {3.68 – 3.50},  $P_{1-4}^b$  {3.65 – 3.32}), 3.15 – 3.13 (m, 3H,  $H^{ba}$  {3.12},  $R^b$  {3.08}), 2.99 (dd, 1H,  $^3J_{H\beta b/H\alpha}$  = 7.3 Hz,  $^2J_{H\beta b/H\beta a}$  = 14.9 Hz,  $H^{\beta b}$ ), 2.74 (d,  $J$  = 11.2 Hz, 1H,  $D^b$ ), 2.51 (d, 1H,  $^3J_{D\beta/D\alpha}$  = 6.6 Hz,  $D^b$ ), 2.16 – 1.69 (m, 21H,  $P_{1-5}^{ba}$  {2.13 – 1.94},  $V^b$  {2.00},  $P_{1-5}^{\gamma}$  {1.96 – 1.77},  $P_{1-5}^{\beta b}$  {1.90 – 1.74}), 1.61 – 1.43 (m, 3H,  $R^{\beta b}$ ,  $R^{\gamma}$ ), 1.39 – 1.09 (m, 12H,  $A_{1-4}^b$  {1.26}, {1.19}), 1.05 (d, 3H,  $^3J_{T1\gamma/T1\beta}$  = 6.0 Hz,  $T_1^{\gamma}$ ), 1.03 (d, 3H,  $^3J_{T2\gamma/T2\beta}$  = 5.7 Hz,  $T_2^{\gamma}$ ), 1.00 (d, 3H,  $^3J_{T3\gamma/T3\beta}$  = 5.8 Hz,  $T_3^{\gamma}$ ), 0.86 (d, 3H,  $^3J_{V\gamma a/V\beta}$  = 6.5 Hz,  $V^{\gamma a}$ ), 0.82 (d, 3H,  $^3J_{V\gamma b/V\beta}$  = 6.5 Hz, 3H,  $V^{\gamma b}$ ) ppm.

$^{13}C$ -NMR (150 MHz, HSQC, HMBC, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  = 174.1, 173.3, 172.4, 172.3, 172.0, 171.8, 171.2, 171.1, 171.0, 170.8, 170.7, 170.5, 170.2, 170.2, 169.8, 169.7, 169.5, 169.1, 169.0, 166.9, 166.6 (C=O-NH, COOH P, COOH D), 163.1, 162.7 (TFA), 157.0 ( $R^e$ ), 133.8 ( $H^e$ ), 129.8 ( $H^{\gamma}$ ), 117.2, 116.9 ( $H^d$ ), 66.9, 66.7, 66.4 ( $T_{1-3}^b$ ), 61.8, 61.7 ( $S_{1-2}^b$ ), 60.0, 59.8, 59.5, 59.2, 58.8 ( $P_{1-5}^a$ ), 58.4, 58.2, 58.0 ( $T_{1-3}^a$ ), 57.9 ( $V^a$ ), 55.4 ( $H^a$ ), 55.1, 54.9 ( $S_{1-2}^a$ ), 51.5 ( $R^a$ ), 50.2 ( $D^a$ ), 49.7, 48.6, 47.8 ( $A_{1-3}^a$ ), 46.9, 46.8, 46.8, 46.7 ( $P_{1-4}^b$ ), 46.4 ( $A_4^a$ ), 45.9 ( $P_5^b$ ), 42.2, 42.0 ( $G_{1-2}^a$ ), 40.7 ( $R^b$ ), 35.7 ( $D^b$ ), 31.7, 30.7, 29.2 ( $P_{1-3}^b$ ), 30.7 ( $V^b$ ), 28.4 ( $P_4^b$ ), 28.0 ( $R^b$ ), 27.2 ( $P_5^b$ ), 24.6 ( $R^{\gamma}$ ), 24.6 ( $H^b$ ), 24.6, 24.4, 23.9, 23.7, 21.9 ( $P_{1-5}^{\gamma}$ ), 19.9 ( $T^{\gamma}$ ), 19.6 ( $V^{\gamma a}$ ), 19.3 ( $T^{\gamma}$ ), 19.2 ( $T^{\gamma}$ ), 18.1 ( $V^{\gamma b}$ ), 17.4, 17.3, 16.9, 16.7 ( $A_{1-4}^b$ ) ppm.

### 5.8.11 L-Prolyl- $\beta^3$ -homo-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl- $\beta^3$ -homo-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl- $\beta^3$ -homo-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl- $\beta^3$ -homo-alanyl-L-prolin (95)

Es fanden die allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV1, AAV3a und AAV5 Anwendung. Fmoc- $\beta^3$ -homo-Ala-OH wurde mit HATU, HOAt und NMM als Base 8 h lang gekuppelt.

Die Reinigung des Rohpeptids erfolgte durch RP-HPLC (5% B – 40' – 40% B). Ausbeute: 88.3 mg (0.04 mmol), 36% eines farblos amorphen Feststoffs.

$C_{84}H_{135}N_{25}O_{28}$ ,  $1943.12 \frac{g}{mol}$ , [1941.9908].

Analytische RP-HPLC:  $R_t$  (5% B – 40' – 40% B): 16.0 min.

ESI-MS (positiv, m/z):  $C_{84}H_{137}N_{25}O_{28}$ ,  $[M+2H]^+$ , ber. 972.00, gef. 972.06.

### 5.8.12 *L*-Prolyl-*L*-prolyl-*N'*-(*N*-Acetyl-*N*-(2-aminoethyl)-*L*-glycyl-*L*-histidyl-*L*-glycyl-*L*-valyl-*L*-threonyl-*L*-seryl-*N'*-(*N*-Acetyl-*N*-(2-aminoethyl)-*L*-glycyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*N'*-(*N*-Acetyl-*N*-(2-aminoethyl)-*L*-glycyl-*L*-prolyl-*L*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanin (97)

Es fanden die allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV2, AAV3b, AAV4 und AAV5 Anwendung. Die Reinigung erfolgte durch RP-HPLC (5% B – 20' – 40% B). Ausbeute: 153 mg (72.8  $\mu$ mol, 73%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

$C_{89}H_{142}N_{28}O_{31}$ ,  $2100.25 \frac{g}{mol}$ , [2099.0396]

Analytische RP-HPLC:  $R_t$ (5% B – 40' – 40% B) = 11.5 min.

HR-ESI-MS (positiv, m/z):  $C_{89}H_{145}N_{28}O_{31}$ ,  $[M+3H]^{3+}$ , ber. 701.0219, gef. 701.0219,  $C_{89}H_{144}N_{28}O_{31}$ ,  $[M+2H]^{2+}$ , ber. 1051.0289, gef. 1051.0285.

$^1H$ -NMR (600 MHz, HSQC, HMBC, COSY, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  = 9.57 (s, 1H, COOH), 8.95 (s, 1H,  $H^e$ ), 8.50 – 8.38 (m, 2H,  $G_{1-2}^{NH}$ ), 8.38 – 8.33 (m, 1H), 8.33 – 8.25 (m, 2H), 8.24 – 8.19 (m, 1H), 8.13 – 8.07 (m, 1H), 8.05 – 7.92 (m, 4H,  $R^{\delta NH}$  {7.86},  $D^{NH}$  {7.86},  $P^{NH}$  {7.87}  $T_3^{NH}$  {7.85}), 7.92 – 7.85 (m, 2H,  $R^{NH}$  {7.97}), 7.85 – 7.74 (m, 2H), 7.74 – 7.66 (m, 1H,  $H^{NH}$ ), 7.63 – 7.49 (m, 2H), 7.39 (s, 1H,  $H^{\delta}$ ), 7.36 – 7.25 (m, 2H,  $T_2^{NH}$  {7.35},  $A^{NH}$  {7.30}), 4.60 – 4.46 (m, 3H,  $R^{\alpha}$  {4.57},  $D^{\alpha}$  {4.51},  $T_1^{\alpha}$  {4.47}), 4.43 – 4.14 (m, 12H,  $S_{1-2}^{\alpha}$  {4.40 – 4.34},  $P_{1-5}^{\alpha}$  {4.33 – 4.20},  $T_3^{\alpha}$  {4.31},  $V^{\alpha}$  {4.21},  $H^{\alpha}$  {4.20},  $T_2^{\alpha}$  {4.19},  $A^{\alpha}$  {4.18}), 4.08 – 3.71 (m, 7H,  $T_1^{\beta}$  {4.06},  $T_2^{\beta}$  {4.03},  $T_3^{\beta}$  {3.94},  $G_{1-2}^{\alpha\alpha}$  {3.88},  $G_{1-2}^{\alpha\beta}$  {3.75}), 3.67 – 3.42 (m, 12H,  $Mim_{1-3}$ -H4a,b {3.64 – 3.39},  $S_{1-2}^{\beta\alpha}$  {3.59},  $S_{1-2}^{\beta\beta}$  {3.54},  $P_1^{\delta}$  {3.55}), 3.40 – 3.01 (m, 17H,  $Mim_{1-3}$ -H3a,b {3.36 – 3.09},  $H^{\beta\alpha}$  {3.15},  $R^{\delta}$  {3.08},  $P_{2-5}^{\delta}$  {3.37 – 3.13},  $Mim_{1-3}$ -H2a,b), 3.01 – 2.93 (m, 1H,  $H^{\beta\beta}$ ), 2.78 – 2.72 (m, 1H,  $D^{\beta\alpha}$ ), 2.57 – 2.52 (m, 1H,  $D^{\beta\beta}$ ), 2.30 – 1.40 (m, 34H,  $P_{1-4}^{\beta\alpha}$  {2.14 – 1.97},  $P_{1-4}^{\beta\beta}$  {1.90 – 1.68},  $CH_3$ -Ac {2.02},  $CH_3$ -Ac {2.01},  $V^{\beta}$  {2.01},  $P_5^{\beta}$  {2.00},  $P_{1-5}^{\gamma}$  {1.89 – 1.77},  $CH_3$ -Ac {1.85},  $R^{\beta\alpha}$  {1.74},  $R^{\beta\beta}$  {1.52},  $R^{\gamma}$  {1.52}), 1.26 (d, 3H,  $^3J_{A\beta/A\alpha}$  = 7.3 Hz,  $A^{\beta}$ ), 1.07 – 1.01 (m, 6H,  $T_1^{\gamma}$

{1.05},  $T_2^\gamma$  {1.03}), 1.01 – 0.96 (m, 3H,  $T_3^\gamma$ ), 0.86 (d, 3H,  $^3J_{V\gamma/V\beta} = 6.7$  Hz,  $V^\gamma$ ), 0.83 (d, 3H,  $^3J_{V\gamma/V\beta} = 6.7$  Hz, 3H,  $V^\beta$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz, HSQC, HMBC, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 173.9, 173.3, 172.1, 171.9, 171.8, 171.7, 171.3, 171.1, 171.0, 170.6, 170.3, 170.2, 170.10, 170.0, 169.7, 169.4, 169.0, 167.7, 167.2, 166.9, 166.8, 166.8, 165.1 (C=O-NH, COOH P, COOH D), 163.1, 162.1 (TFA), 156.8 ( $R^\epsilon$ ), 133.9, 133.7 ( $H^\epsilon$ ), 129.3, 129.0 ( $H^\gamma$ ), 117.2, 115.3 ( $H^\delta$ ), 66.8, 66.1, 66.3 ( $T_{1-3}^\beta$ ), 61.8, 61.5 ( $S_{1-2}^\beta$ ), 60.2, 60.1, 60.1, 59.9, 59.7 ( $P_{1-5}^\alpha$ ), 58.3, 58.1, 57.9 ( $T_{1-3}^\alpha$ ), 57.8 ( $V^\alpha$ ), 55.3 ( $H^\alpha$ ), 55.0, 54.8 ( $S_{1-2}^\alpha$ ), 51.6 ( $R^\alpha$ ), 50.1 ( $D^\alpha$ ), 49.8, 49.6 (Mim-C2), 48.8 ( $P^\delta$ ), 48.6 (Mim-C2), 48.0 (Mim-C4), 47.7 ( $A^\alpha$ ), 46.9, 46.8, (Mim-C4), 46.7, 46.5, 46.3, 46.0, 45.9 ( $P_{1-5}^\delta$ ), 42.3, 42.0 ( $G_{1-2}^\alpha$ ), 40.7 ( $R^\delta$ ), 37.5, 37.3, 36.8 (Mim-C3), 35.6 ( $D^\beta$ ), 31.9 ( $P_1^\beta$ ), 30.7 ( $V^\beta$ ), 30.2, 29.4, 29.3, 29.2 ( $P^\beta$ ), 28.2 ( $R^\beta$ ), 27.0 ( $H^\beta$ ), 24.6 ( $R^\gamma$ ), 24.4, 24.3, 23.7, 23.6, 21.8 ( $P_{1-5}^\gamma$ ), 21.4, 21.1, 21.0 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 19.9, 19.8, 19.3 ( $T_{1-3}^\gamma$ ), 19.2, 18.0 ( $V^\gamma$ ), 17.2 ( $A^\beta$ ) ppm.

### 5.8.13 *L*-Prolyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-glycin-*L*-histidyl-*L*-glycyl-*L*-valyl-*N'*-(*N*-((2-Hydroxyacetyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galctopyranosyl)))-(2-aminoethyl)-glycyl-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-glycyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-glycyl-*L*-prolyl-*L*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanin (98)

Es fanden die allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV2, AAV3b, AAV4 und AAV5 Anwendung. Die Reinigung erfolgte durch RP-HPLC (5% B – 20' – 40% B). Ausbeute: 152 mg (63.8  $\mu\text{mol}$ , 64%) eines farblosen amorphen Feststoffs.

$\text{C}_{101}\text{H}_{156}\text{N}_{28}\text{O}_{38}$ , 2370.50  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , [2369.1022]

ESI-MS (positiv, m/z):  $\text{C}_{89}\text{H}_{159}\text{N}_{28}\text{O}_{38}$ ,  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ , ber. 790.7007, gef. 790.7129.

$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, COSY, HSQC, HMBC, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  = 9.56 (s, 1H, COOH), 8.96 (s, 1H,  $H^\epsilon$ ), 8.45 (s, 1H, NH), 8.30 – 8.14 (m, 2H,  $G_{1-2}^{\text{NH}}$ ), 8.14 – 7.93 (m, 5H,  $A_4^{\text{NH}}$  {8.10},  $A_2^{\text{NH}}$  {8.09},  $H^{\text{NH}}$  {8.08}, GalNAc-NH {8.05},  $A_3^{\text{NH}}$  {7.95}), 7.79 (d, 2H,  $^3J_{S1\text{NH}/S1\alpha} = ^3J_{S2\text{NH}/S2\alpha} = 7.3$  Hz,  $S_{1-2}^{\text{NH}}$ ), 7.70 (d, 1H,  $^3J_{T1\text{NH}/T1\alpha} = 8.7$  Hz,  $T_1^{\text{NH}}$ ), 7.58 (m, 1H,  $R^{\delta\text{NH}}$ ), 7.43 – 7.27 (m, 2H,  $H^\delta$  {7.38}), 5.31 (bs, 1H, GalNAc-H4), 5.08 – 5.04 (m, 1H, GalNAc-H3), 4.97 (d, 1H  $^3J_{\text{GalNAc-H1}/\text{GalNAc-H2}} = 3.2$  Hz, GalNAc-H1), 4.93 (d, 1H,  $^3J_{\text{GalNAc-H1}/\text{GalNAc-H2}} = 3.2$  Hz, GalNAc-H1), 4.65 – 4.60 (m, 1H,  $V^\alpha$ ), 4.60 – 4.42 (m, 6H,  $H^\alpha$  {4.58},  $D^\alpha$  {4.56},  $A_1^\alpha$  {4.54},  $R^\alpha$  {4.51},  $P_1^\alpha$  {4.50},  $A_2^\alpha$  {4.46}), 4.41 – 4.15 (m, 14H, hAc-H2 (Rotamer 1) {4.39},  $S_{1-2}^\alpha$  {4.38-4.34},  $P_{2-5}^\alpha$  {4.36-4.25}, GalNAc-H5 {4.31}, GalNAc-H2 {4.26}, hAc-H2 (Rotamer 2) {4.28-4.17},  $T_1^\alpha$  {4.21},  $A_3^\alpha$  {4.18},  $A_4^\alpha$  {4.16}), 4.13 – 3.92

(m, 6H,  $T_2^\alpha$  {4.11}, H4a {4.07},  $T_1^\beta$  {4.06}, GalNAc-H6a {4.05}, H4b {4.01}, GalNAc-H6b {3.96},  $T_2^\beta$  {3.95}), 3.92 – 3.42 (m, 18H,  $G_1$  {3.89},  $G_2$  {3.76},  $P_{1-5}^\delta$  {3.69-3.42},  $S_2^\beta$  {3.65},  $S_1^\beta$  {3.56}), 3.42 – 3.04 (m, 7H,  $P_6^\delta$  {3.31-3.16}, H3a {3.24},  $H^{\beta a}$  {3.13}, H3b {3.11},  $R^\delta$  {3.09}), 2.98 (dd, 1H,  $^2J_{H\beta b/H\beta a} = 14.5$  Hz,  $^3J_{H\beta b/H\alpha} = 7.6$  Hz,  $H^{\beta b}$ ), 2.74 (dd, 1H,  $^2J_{D\beta a/D\beta b} = 10.3$  Hz,  $^3J_{D\beta a/D\alpha} = 5.8$  Hz,  $D^{\beta a}$ ), 2.54 – 2.51 (m, 1H,  $D^{\beta b}$ ), 2.43 – 2.35 (m, 1H,  $P_1^{\beta a}$ ), 2.25 (m, 1H,  $P_1^{\beta b}$ ), 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-NHAc), 2.06 – 1.74 (m, 31H,  $P_{2-6}^\beta$  {2.07 – 1.76},  $P_{1-6}^\gamma$  {1.98 – 1.83}, CH<sub>3</sub>-Ac {1.98}{1.89}{1.83}), 1.71 (m, 1H,  $R^{\beta a}$ ), 1.56 – 1.48 (s, 3H,  $R^\gamma$  {1.53},  $R^{\beta b}$  {1.52}), 1.26 (d, 3H,  $^3J_{A1\beta/A1\alpha} = 7.8$  Hz,  $A_1^\beta$ ), 1.21 – 1.13 (m, 9H,  $A_{2-4}^\beta$  {1.22}{1.20}{1.19}), 1.05 (d, 3H,  $^3J_{T1\gamma/T1\beta} = 6.4$  Hz,  $T_1^\beta$ ), 1.00 (d, 3H,  $^3J_{T2\gamma/T2\beta} = 6.2$  Hz,  $T_2^\beta$ ), 0.82 (t, 6H,  $^3J_{V\gamma b/V\gamma a} = 7.2$  Hz,  $V^{\gamma b}$ ) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, HSQC, HMBC, DMSO-d),  $\delta$  = 173.9, 172.4, 172.1, 171.9, 171.7, 171.5, 171.1, 171.0, 170.9, 170.7, 170.6, 170.3, 170.1, 170.0, 170.0, 169.9, 169.8, 169.8, 169.7, 169.5, 169.4, 169.3, 169.2, 169.0, 168.9, 168.7, 168.24, 166.2, (C=O-NH, COOH A, COOH D), 156.8 ( $R^\epsilon$ ), 133.7 ( $H^\epsilon$ ), 129.1 ( $H^\gamma$ ), 117.1 ( $H^\delta$ ), 97.6, 97.3 (GalNAc-C1, Rotamer), 67.5 (GalNAc-C3), 67.0 (GalNAc-C4), 66.8 ( $T_2^\beta$ ), 66.5 ( $T_1^\beta$ ), 66.4 (GalNAc-C5), 65.1, 65.0 (hAc-C2, Rotamer), 61.8 ( $S_{1-2}^\beta$ ), 61.4 (GalNAc-C6), 59.8, 59.6, 59.6, 59.4, 59.1, 58.2 ( $P_{1-6}^\alpha$ ), 58.2  $A_1^\alpha$ , 58.0 ( $V^\alpha$ ), 57.9 ( $T_2^\alpha$ ), 57.7 ( $T_1^\alpha$ ), 54.9, 54.8 ( $S_{1-2}^\alpha$ ), 51.4 ( $H^\alpha$ ), 50.1 ( $R^\alpha$ ), 49.4 ( $D^\alpha$ ), 49.4 (C4), 48.3 (C2), 48.4  $A_2^\alpha$ , 47.6  $A_3^\alpha$ , 47.1 (GalNAc-C2), 46.8 ( $P_{1-6}^\delta$ ), 46.3  $A_4^\alpha$ , 46.5 ( $R^\alpha$ ), 45.9 ( $P_{1-6}^\delta$ ), 42.0, 41.9 ( $G_{1-2}^\alpha$ ), 40.6 ( $R^\delta$ ), 36.2 (C3), 35.6 ( $D^\beta$ ), 30.40, 30.3 ( $V^\beta$ ), 29.1, 28.9, 27.7 ( $P_{1-6}^\beta$ ), 28.3 ( $R^\beta$ ), 27.0 ( $H^\beta$ ), 24.5 ( $R^\gamma$ ), 24.4, 23.6  $P_{1-6}^\gamma$ , 22.5 (CH<sub>3</sub>-NHAc), 20.6 (CH<sub>3</sub>-Ac), 20.5 (CH<sub>3</sub>-Ac), 20.5 (CH<sub>3</sub>-Ac), 19.8 ( $T_1^\gamma$ ), 19.5 ( $T_2^\gamma$ ), 19.2, 18.0 ( $V^\gamma$ ), 17.6, 17.2, 16.8, 16.6 ( $A_{1-4}^\beta$ ) ppm.

## 5.9 Versuche zu 4.8 – Stabilitätstests

### 5.9.1 Pufferherstellung

Für den Trizma-Puffer pH 7.8 wurden 364.5 mg (50.00 mmol) Trizma® Puffer Substanz (Sigma Aldrich, 93778) und 54.8 mg (5.00 mmol) Calciumchlorid Hexahydrat (Sigma Aldrich, 21108) in 50.00 mL Reinstwasser gelöst

### 5.9.2 Erstellen der Kalibrationsgeraden

Zur Aufnahme der Kalibrationsgeraden wurden Lösungen mit einer Konzentration von 0.0 mg, 0.25 mg, 0.50 mg, 0.75 mg, 1.00 mg, 1.5 mg, 2.00 mg, 2.50 mg, 3.00 mg, 3.50 mg, 4.00 mg, 4.50 mg und 5.00 mg pro Milliliter aus einer StammLösung mit einer Konzentration von 5.00 mg/mL hergestellt. Die Proben wurden mit dem in Tab. 6 dargestellten Gradienten bei 212 nm auf einer analytischen Luna-Säule (Phenomenex, 5 µm, C18(2), 300 Å, 250 x 4.6 mm) mit einem Fluss von 1.0 mL/min vermessen. Nach einer Basislinienkorrektur wurden die Absorptionsflächen gegen die Konzentration aufgetragen.

Zeit [min]	Eluent A: H <sub>2</sub> O + 0.1% TFA	Eluent B: MeCN+ 0.1% TFA
0	95	5
40	60	40
50	0	100

Tab. 6 Gradient zur Aufnahme der Kalibrationsgeraden.

### 5.9.3 Enzymatischer Abbaustudien mit Proteinase K auf Eupergit® C

Aus einer StammLösung von 30 mg Peptid in 1.0 mL des oben beschriebenen Trizma-Puffers wurden 50 µL entnommen und zu einer Suspension von Proteinase K auf Eupergit® C (Sigma Aldrich, 82452) in 500 µL Trizma-Puffer gegeben. Die Suspension wurde bei 37 °C für einen entsprechenden Zeitraum in einer Vortexeinheit inkubiert. Um Proteinase K zu inhibieren, wurden 100 µL 20%ige Essigsäure zugegeben und die Suspension wurde auf Raumtemperatur gekühlt. War die Aufnahme des HPLC-Chromatogramms am gleichen Tag nicht mehr möglich, wurde die Probe über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag vermessen. Die Absorptionsflächen wurden nach einer Basislinienkorrektur und relativ zur Startkonzentration gegen die Zeit aufgetragen.



Zeit [min]	Menge Proteinase [mg]	Fläche MUC1	Restpeptid [%]	Menge Proteinase [mg]	Fläche MUC1	Restpeptid [%]
0.0	0.0	185.9	100.0	0.0	396.4	100.0
1.0	2.1	157.3	84.6	2.5	342.1	86.3
2.0	1.7	115.8	62.3	2.2	279.3	70.5
5.0	1.5	125.0	67.2	2.3	244.2	61.6
7.0	2.0	110.2	59.3	2.6	67.7	17.1
10.0	2.0	67.9	36.5	2.6	0.0	0.0

Zeit [min]	Menge Proteinase [mg]	Fläche Verbindung 95 [mAu*min]	Restpeptid [%]	Menge Proteinase [mg]	Fläche Verbindung 97 [mAu*min]	Restpeptid [%]
0.0	0.0	501.8	100.0	0.0	417.5	100
1.0	2.5	445.1	88.7	1.6	435.2	104.5
2.0	2.2	443.9	88.5	1.6	452.5	108.9
5.0	2.3	387.6	77.2	1.6	421.9	101.1
7.0	2.6	370.1	73.8	1.9	378.3	90.1
10.0	2.6	358.7	71.5	2.1	294.8	68.9

Tab. 7 Enzymatischer Abbau von verschiedenen Modellpeptiden durch Proteinase K.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei vielen Menschen auf dem Weg zur und durch die Promotion bedanken. Mein Dank gilt Frau Prof. Hoffmann-Röder für die Vergabe des interessanten Themas, den nötigen Freiraum und für die vielen fruchtbaren Diskussionen. Weiterhin möchte ich mich an dieser Stelle für das entgegengebrachte Vertrauen während ihrer Abwesenheit bedanken.

Den ehemaligen und aktiven Mitgliedern der Arbeitskreise Hoffmann-Röder, Kunz und Opatz gilt mein Dank für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft. Ein besonderer Dank gilt Sarah, Thomas, Jérôme, Nancy und Claudine sowie Corinna und Markus für das äußerst hohe Gesprächsniveau vor, während und nach der Arbeitszeit.

Herrn Prof. Kunz möchte ich für seine Zeit und Herzlichkeit danken.

Den analytischen Abteilungen der Universitäten in Mainz und München danke ich für das Messen zahlreicher NMR- und Massenspektren.

Den Forschungspraktikanten Moritz Schubert, Kerstin Niederer, Sabine Gietzen, Markus Daum und Thomas Leißing möchte ich für das Vorantreiben kleinerer Projekte danken.

Johanna und Jochen danke ich für die Zeit während des Studiums, der Diplomarbeit und der Promotion. Auch hier nochmals Danke an Nancy, die natürlich nicht nur als Laborkollegin, sondern auch als Freundin eine Bereicherung in meinem Leben war und ist.

Ein Dankeschön geht auch an Bereich R&D der BACHEM AG, für die Akzeptanz, dass es am Ende doch länger dauerte.

Ein großes Dankeschön gebührt meinen Eltern, die immer hinter mir standen und mich auf meinem Weg unterstützt haben. Vieles wäre ohne sie gar nicht oder nicht in diesem Zeitrahmen möglich gewesen. Dafür kann ich mich in diesen wenigen Zeilen nicht genug bedanken.

Und zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Frau, Martina, die mich seit meiner Diplomarbeit begleitet, für die vielen Stunden abends und am Wochenende, die wir durch

Labor oder Schreibtisch getrennt verbrachten, bedanken. Danke vor allem für die Akzeptanz, die Promotion in München zu beenden, und dass du trotz meiner Bedenken nach München gezogen bist.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Erstes Glycopeptid des MUC1 20mers mit $\beta$ -homo-Tn an Position 6. ....	8
Abb. 1.2 PNA-Analoga des Tn-( <b>75</b> und <b>76</b> ), T-( <b>82</b> ) und sTn-Antigens ( <b>79</b> und <b>80</b> ).....	9
Abb. 1.3 Neue Peptidmimetika mit $\beta$ -Aminosäuren oder $\alpha$ AA-Aminosäuren. ....	10
Abb. 2.1 Die häufigsten Tumorlokalisationen der Krebsverstorbenen 2011 (BN = bösartige Neubildung). ....	11
Abb. 2.2 Sechs Merkmale der Krebszelle nach Hanahan und Weinberg. ....	12
Abb. 2.3 Das Mucin MUC1, dessen tandem repeat unit und die tumor-assoziierten Kohlenhydratantigene als Unterscheidungsmerkmale. ....	15
Abb. 2.4 Die für das MUC1 relevanten TACAs. ....	15
Abb. 2.5 Glycopeptid-Vakzin aus der Gruppe Kunz und schematischer Aufbau des gezeigten Glycopepti-Vakzins. ....	18
Abb. 2.6 Schematische Darstellung der Costimulation zwischen B- und T-Zellen. ....	19
Abb. 2.7 S-Glycosidanaloga des Tamm-Horsfall-Proteins <b>I</b> und des T-Antigens <b>II</b> . Struktur <b>III</b> zeigt ein Strukturmerkmal des GM <sub>3</sub> Gangliosidglycopeptids als Thioglycosid. ....	21
Abb. 2.8 Die C-Glycoside des Tn- und des sTn-Antigens ( <b>IV</b> und <b>V</b> ) bzw. des T-Antigens als KLH-Konjugat <b>VI</b> . ....	22
Abb. 2.9 Das Disaccharid des sialyl-LeX <b>VII</b> und Oseltmivir <b>VIII</b> . ....	22
Abb. 2.10 Ein Vakzin aus der Gruppe Hoffmann-Röder mit fluorierten Kohlenhydratresten. ....	23
Abb. 2.11 Übersicht über gängige Peptidrückgrat-Modifikationen. ....	24
Abb. 2.12 Die immundoninanten T-Zellepitope <b>X</b> (gelb) und <b>XI</b> (blau) im Vergleich gebunden an den MHC1-Komplex H-2K <sup>b</sup> (Kristallstruktur). Der Pfeil deutet auf den Einbau des $\beta^3$ -Phe hin. Die Tabelle unten zeigt die metabolische Stabilität gegenüber Serum und einigen ausgewählten Proteasen. ....	26
Abb. 2.13 Die von den Gruppen Norgren und Hoffmann-Röder dargestellten Tn- Antigenanaloga. ....	27
Abb. 2.14 Koordination und Hydrolyse von $\alpha$ - und $\beta$ -Peptiden in einer Zinkprotease. ....	27
Abb. 2.15 Peptoid-Hybridpeptid als Inhibitor des bovinen $\alpha$ -Chymotrypsins. ....	29
Abb. 2.16 Sandostatin <b>XVII</b> und ein Wirkstoffanalogon mit $\alpha$ -Peptoidpartial-struktur <b>XVIII</b> . ....	30
Abb. 2.17 Ein $\alpha$ -AA- <b>XIX</b> und ein $\gamma$ -AA-Peptid <b>XX</b> , die die p53/MDM-Aggregation beeinflussen können. ....	31
Abb. 3.1 Die Abbildung zeigt die MUC1-tandem repeat unit. Natürliche Aminosäuren sind schwarz dargestellt. Mögliche Modifikationspositionen sind farbig	

gekennzeichnet. Dabei steht <b>rot</b> für $\beta^3$ -Aminosäuren und <b>blau</b> für die AAP-Elemente.....	36
Abb. 4.1 Dipolmomente und Hyperkonjugation in Galctosylbromid <b>3</b> .....	38
Abb. 4.2 Vergleich der $\alpha$ -Peptid- mit den AAP-Strukturelementen.....	57
Abb. 4.3 Vergleich der HMBC-Spektren der sTn-Analoga <b>79</b> (oben) und <b>80</b> (unten).	
<b>Links</b> : Korrelation zwischen Sia-H3ax und Sia-C1. <b>Rechts</b> : Fehlender Kreuzpeak ( $\beta$ -Glycosid) .....	62
Abb. 4.4 Schematische Darstellung des Einflusses der Mikrowellen-strahlung auf die Rückfaltung von Peptidstängen an der festen Phase. ....	67
Abb. 4.5 Die Trityl-, Pbf- und Pmc-Schutzgruppe. ....	67
Abb. 4.6 Gängige Kupplungsreagenzien in der Peptidsynthese. ....	68
Abb. 4.7 Aus den NOESY-Spektren ermittelte Konnektivitäten.....	79
Abb. 4.8: Das modifizierte Peptid <b>93</b> mit $\beta^3$ -homo-Tn <sup>6</sup> als Referenz zum Zeitpunkt t = 0.	80
Abb. 4.9: Das modifizierte Peptid <b>93</b> mit $\beta^3$ -homo-Tn <sup>6</sup> nach t = 24 h.....	81
Abb. 4.10 Die Kalibrationsgerade für die Peptide <b>94</b> , <b>95</b> und <b>97</b> . ....	82
Abb. 4.11: Grafische Darstellung des Restgehalts an Peptid in Lösung nach Inkubation mit Proteinase K auf Eupergit <sup>®</sup> C und 37 °C.....	83
Abb. 4.12 HPLC-Vergleich von MUC1 <b>94</b> nach t = 0 min (1) und t = 10 min (2).	
Vergleich von <b>97</b> nach t = 0 min und t = 10 min (3+4).....	84



## Schemenverzeichnis

Schema 1.1 Arndt-Eistert-Reaktion zu Vertretern der TACAs des MUC1. ....	8
Schema 1.2 Darstellung fluorierter TACAs ausgehend von Alken <b>50</b> .....	9
Schema 2.1 Die Biosynthese der sililylierten TACAs auf Tumorzellen. ....	16
Schema 2.2 Benennung der Aminosäuren und im Labor gängige Methoden zur Darstellung von $\beta^3$ -Aminosäuren. ....	25
Schema 3.1 Retrosynthese des Fmoc- $\beta^3$ -hThr( $\alpha$ Ac <sub>4</sub> NeuAcCOOBn-(2→6)- $\alpha$ Ac <sub>2</sub> GalNAc)- OH <b>22c</b> . ....	32
Schema 3.2 Retrosynthese des Fmoc- $\beta^3$ -hThr( $\beta$ Ac <sub>4</sub> Gal-(1→3)-[ $\alpha$ Ac <sub>4</sub> NeuAcCOOBn- (2→6)]- $\alpha$ Ac <sub>2</sub> GalNAc)-OH <b>25c</b> . ....	33
Schema 3.3 Retrosynthese der AAPs. ....	34
Schema 4.1 Synthese des Galactosylbromids <b>3</b> . ....	37
Schema 4.2 Darstellung des Azidobromids <b>6</b> bzw. Azidochlorids <b>5</b> . ....	38
Schema 4.3 Mechanismus der Azidochlorierung bzw. Azidonitratisierung. ....	39
Schema 4.4 Synthese der vollständig geschützten Donorvorstufe <b>9</b> . ....	40
Schema 4.5 Synthese des Xanthogenatdonors <b>11</b> . ....	40
Schema 4.6 Synthese des Sialinsäuredonors <b>14</b> . ....	41
Schema 4.7 Synthese des orthogonal geschützten Threoninbausteins <b>17</b> und Mechanismus der DCC-Aktivierung. ....	42
Schema 4.8 Darstellung des deblockierten Tn-Antigenanalogons <b>20</b> . ....	43
Schema 4.9 Synthese des sTn-Antigens <b>21</b> . ....	44
Schema 4.10 Aktivierung der Xanthogenate durch Methylsulfonylbromid und Silbertriflat. ....	45
Schema 4.11 Darstellung des für die Arndt-Eistert-Reaktion geschützten sTn-Antigens <b>22a</b> ....	46
Schema 4.12 Blockierung der 4- und 6-Position des Tn-Antigens <b>23</b> . ....	46
Schema 4.13 Synthese des sT-Antigenanalogons <b>25b</b> . ....	47
Schema 3.13 Synthese des T-Antigens <b>24</b> . ....	47
Schema 4.15 Mechanismus der Addition von primären Alkoholen an elektronenreiche Glycale nach Balmond et al. ....	48
Schema 4.16 Darstellung der TACAs als $\beta^3$ -homo-Threoninkonjugate ....	49
Schema 4.17 Versuche zur Darstellung von orthogonal geschütztem $\beta^3$ -homo-Serin und $\beta^3$ -homo-Threonin. ....	50
Schema 4.18 Darstellung der Hybridpeptide <b>38</b> und <b>39</b> . ....	50
Schema 4.19 Glycosylierungsversuche an den Hybriddipeptiden <b>38</b> und <b>39</b> . ....	51
Schema 4.20 Darstellung des Phosphonats <b>44</b> in einer Michaelis-Arbuzov-Reaktion. ....	53
Schema 4.21 Darstellung der Michael-Systeme <b>50</b> und <b>51</b> . ....	53
Schema 4.22 Synthese des 2F- $\beta^3$ -homo-Serin <b>52</b> . ....	54

Schema 4.23 Mechanismus der enantioselektiven Amidaddition und der diastereoselektiven Fluorierung mit NFSI. ....	54
Schema 4.24 Von Merck postulierter Mechanismus zur Benzaldehydspaltung und Bildung des geminalen Difluorids.....	55
Schema 4.25 Deblockierung der TBDMS-geschützten Hydroxylfunktion. ....	56
Schema 4.26 Postulierter Mechanismus zur Bildung von Benzaldehyd und geminalen Difluoriden aus 2-Fluor- $\beta^3$ -homo-Serin durch Oxidation mit NFSI. ....	56
Schema 4.27 Darstellung von Hydroxyessigsäure- und $\gamma$ -Hydroxybuttersäure-tert.-butylester <b>58</b> und <b>61</b> . ....	57
Schema 4.28 Herstellung der glycosylierten $\omega$ -Hydroxycarbonsäuren <b>66</b> und <b>67</b> . ....	58
Schema 4.29 Mechanismus der mono-Veresterung zu Verbindung <b>60</b> . ....	58
Schema 4.30 Darstellung des Rückgrat-Bausteins <b>70</b> und des freien Amins <b>70a</b> . ....	59
Schema 4.31 Acetylierung des freien Amins <b>70a</b> unter verschiedenen Reaktionsbedingungen. ....	59
Schema 4.32 Darstellung der Benzyloxyessigsäure <b>73a</b> . ....	59
Schema 4.33 Synthese der Tn-Analoga <b>77</b> und <b>78</b> als AAP-Bausteine. ....	60
Schema 4.34 Basenstabilität der $\alpha$ AAP-Bausteine und $\beta$ -Eliminierung bei Threoninkonjugaten.....	61
Schema 4.35 Herstellung der sTn-Antigenanaloga <b>79</b> und <b>80</b> auf PNA-Basis.....	61
Schema 4.36 Gleichgewicht zwischen stabilen Rotameren aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Amidbindung. ....	62
Schema 4.37 Synthese des T-Analogons <b>82</b> in einer Helferich-Glycosylierung. ....	63
Schema 4.38 Darstellung des Festphasenbausteins <b>75a</b> . ....	63
Schema 4.39 Synthese des nicht-immunogenen Triethylenglycol-Linkers <b>89a</b> . ....	64
Schema 4.40 Schematische Darstellung der Harze mit Trityl- und Wang-Linker. Mechanismus der Diketopiperazinbildung. ....	66
Schema 4.41 Mechanismus der Fmoc-Deblockierung mit Piperidin als Base. ....	68
Schema 4.42 Mechanismus der HATU-Aktivierung. ....	69
Schema 4.43 Synthese der PDTRPAP-Sequenz am ABI 433A.....	71
Schema 4.44 Synthese der PD(hT)RPAP-Sequenz am ABI 433A.....	72
Schema 4.45 Synthese des Glycopeptids <b>93</b> mit Triethylenglycolspacer und $\beta^3$ -homo-Tn-Antigenanalogon an Position <b>6</b> . ....	73
Schema 4.46 Synthese des tandem repeat unit des humanen MUC1.....	75
Schema 4.47 Synthese des MUC1-Hybridpeptids <b>95</b> . ....	76
Schema 4.48 Synthese des Peptidmimetikums mit Alanin-Analogon <b>71a</b> . ....	77
Schema 4.49 Synthese des Glypeptidmimetikums <b>98</b> mit Tn-Antigenanalogon <b>75a</b> . ....	78

## Abkürzungsverzeichnis

[ $\alpha$ ]	Spezifischer Drehwert	DIPEA	<i>N</i> -Ethyldiisopropylamin
Ac	Acetyl	DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylamino-pyridin
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid	DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
AcOH	Essigsäure	EtOAc	Essigsäureethylester, Ethylacetat
Ala, A	Alanin	ESI-MS	Electro Spray Ionisation Mass Spectrometry
äq	äquatorial	Et	Ethyl
Äq	Äquivalente	et al.	et alii (und andere)
Arg, R	Arginin	EtOH	Ethanol
Asp, D	Asparaginsäure	Fmoc	<i>N</i> -(9H-fluorenyl)-methoxycarbonyl
AS	Aminosäure	Gal	D-Galactose
Bn	Benzyl	GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalctosamin
BS	Bersteinsäure	Gly, G	Glycin
Bzn	Benzyliden	hAc	2-Hydroxyessigsäure
c	Konzentration	HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphat
cHex	Cyclohexan	$\gamma$ HBA	$\gamma$ -Hydroxybuttersäure
COMU	1-[1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)-dimethylamino-morpholino]-uronium Hexafluorophosphat	HBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphat
COSY	Correlated Spectroscopy		
d	Tag		
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid		

His, H	Histidin	NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	NMR	Kernresonanz-spektroskopie
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol	OMs	Methylsulfonat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol	OTf	Trifluormethansulfonat
HPLC	High Performances Liquid Chromatography	<i>p</i>	<i>para</i> -
hSer	$\beta^3$ -homo-Serin	Pbf	2,2,4,6,7-Penta-methyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	PEG	Polyethylenglycol
hThr	$\beta^3$ -homo-Threonin	Ph	Phenyl
Hz	Hertz	Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethyl-chroman-6-sulfonyl
<i>J</i>	Kopplungskonstante [Hz]	ppm	parts per million
kat.	katalytisch	<i>p</i> TsOH	para-Toluolsulfonsäure
konz.	konzentriert	quant.	quantitativ
M	molar, molekulare Masse	R <sub>f</sub>	ratio of fronts (Retentionsfaktor)
Me	Methyl	R <sub>t</sub>	Retentionszeit
MeCN	Acetonitril	RP	reversed phase
MeOH	Methanol	Ser, S	Serin
min	Minuten	SG	Schutzgruppe
MS	Massenspektrometrie	SPPS	solid phase peptide synthesis
NaOMe	Natriummethanolat	Su	Succinimidyl
NeuNAc	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure		
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin		

---

TAA	tumorassoziertes Antigen TACA tumorassozierten Kohlen-hydratantigen
TBAF	Tetrabutylammonium- fluorid
<i>t</i> Bu	<i>tert.</i> -butyl
<i>t</i> BuOH	<i>tert.</i> -Butanol
TEG	Triethylenglycol
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thr, T	Threonin
TIPS	Triisopropylsilan
Trt	Trityl, Triphenylmethyl
Val, V	Valin





## Literaturverzeichnis

- [1] *Todesursachen in Deutschland* Statistisches Bundesamt, 02.04.2013, [www.destatis.de](http://www.destatis.de)
- [2] *Deutsche Krebshilfe e.V. - Krebszahlen 2012*, 16.05.2013, [www.krebshilfe.de/krebszahlen.html](http://www.krebshilfe.de/krebszahlen.html)
- [3] *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*, D. Hanahan, Robert A. Weinberg, *Cell* **2011**, 144, 646-674.
- [4] *Krebs in Deutschland 2007/2008, Vol. 8. Ausgabe*, Robert-Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister Deutschland e.V., Berlin, **2012**.
- [5] *Pilot study of mutant ras peptide-based vaccine as an adjuvant treatment in pancreatic and colorectal cancers*, A. Toubaji, M. Achtar, et al., *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, 57, 1413-1420.
- [6] *Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer*, B. Morrison, C. Schmidt, et al., *Breast Cancer Res.* **2008**, 10, 1-14.
- [7] *Therapeutic Cancer Vaccines: Current Status and Moving Forward*, J. Schlom, *J. Natl. Cancer Inst.* **2012**, 104, 599-613.
- [8] *The Search for Infectious Causes of Human Cancers: Where and Why (Nobel Lecture)*, H. zur Hausen, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48, 5798-5808.
- [9] *Cancer vaccine emerging treatment: present and future prospectives*, T. M. Kalyankar, S. R. Butle, P. B. Harshe, R. B. Kakde, *Asian J Pharm Clin Res* **2012**, 5, 33-39.
- [10] *MUC1 as a target antigen for cancer immunotherapy*, B. Acres, J.-M. Limacher, *Expert Rev. Vaccines* **2005**, 4, 493-502.
- [11] *Regulation of protein O-glycosylation by the endoplasmic reticulum-localized molecular chaperone Cosmc*, T. Ju, R. P. Aryal, C. J. Stowell, R. D. Cummings, *J. Cell Biol.* **2008**, 182, 531-542.
- [12] *Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases*, M. C. Rose, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **1992**, 263, L413-L429.
- [13] *Mucins in cancer: protection and control of the cell surface*, M. A. Hollingsworth, B. J. Swanson, *Nat Rev Cancer* **2004**, 4, 45-60.
- [14] *The MUC family: an obituary*, J. Dekker, J. W. A. Rossen, H. A. Büller, A. W. C. Einerhand, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, 27, 126-131.
- [15] *The Structure and Assembly of Secreted Mucins*, J. Perez-Vilar, R. L. Hill, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 31751-31754.
- [16] *Cell signaling through membrane mucins*, K. L. Carraway, V. P. Ramsauer, B. Haq, C. A. Carothers Carraway, *BioEssays* **2003**, 25, 66-71.
- [17] *Die Rolle der Rezyklisierung in der O-Glykosylierung des transmembranen Glykoproteins MUC1*, H. Razawi, Dissertation thesis, Universität Köln (Köln), **2013**.
- [18] *MUC1 Immunotherapy*, R. Beatson, J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, *Immunotherapy* **2010**, 2, 305-327.
- [19] *Association of the DF3/MUC1 Breast Cancer Antigen with Grb2 and the Sos/Ras Exchange Protein*, P. Pandey, S. Kharbanda, D. Kufe, *Cancer Res.* **1995**, 55, 4000-4003.
- [20] *Molecular cloning and analysis of the mouse homologue of the tumor-associated mucin, MUC1, reveals conservation of potential O-glycosylation sites, transmembrane, and cytoplasmic domains and a loss of minisatellite-like polymorphism*, A. P. Spicer, G. Parry, S. Patton, S. J. Gendler, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 15099-15109.
- [21] *Soluble MUC1 and serum MUC1-specific antibodies are potential prognostic biomarkers for platinum-resistant ovarian cancer*, R. Budiu, G. Mantia-Smaldone, et al., *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, 60, 975-984.
- [22] *Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property*, J. Hilkens, M. J. L. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, 17, 359-363.

- [23] *Interaction of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  with the DF3/MUC1 Carcinoma-Associated Antigen and  $\beta$ -Catenin*, Y. Li, A. Bharti, et al., *Mol. Cell. Biol.* **1998**, 18, 7216-7224.
- [24] *The human tumour-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM*, D. M. Swallow, S. Gendler, et al., *Nature* **1987**, 328, 82-84.
- [25] *MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin*, F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, 10, 439-449.
- [26] *A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes*, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, et al., *Int. J. Cancer* **1989**, 44, 691-696.
- [27] *Biophysical Characterization of One-, Two-, and Three-Tandem Repeats of Human Mucin (muc-1) Protein Core*, J. D. Fontenot, N. Tjandra, et al., *Cancer Res.* **1993**, 53, 5386-5394.
- [28] *Epitope Mapping of Antigenic MUC1 Peptides to Breast Cancer Antibody Fragment B27.29: A Heteronuclear NMR Study†*, J. S. Grinstead, J. T. Schuman, A. P. Campbell, *Biochemistry* **2003**, 42, 14293-14305.
- [29] *A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas*, A. Girling, J. Bartkova, et al., *Int. J. Cancer* **1989**, 43, 1072-1076.
- [30] *Development of an anti-idiotypic antibody reactive with an antibody defining the epitope R P A P in the muc-1 epithelial mucin core*, J. L. Bashford, R. Adrian Robins, M. R. Price, *Int. J. Cancer* **1993**, 54, 778-783.
- [31] *Induction of antibody responses to breast carcinoma associated mucins using synthetic peptide constructs as immunogens*, G. Denton, M. Sekowski, M. R. Price, *Cancer Lett* **1993**, 70, 143-150.
- [32] *Epitope mapping of anti-breast and anti-ovarian mucin monoclonal antibodies*, X. Pei-Xiang, J. Prenzoska, I. F. C. McKenzie, *Mol. Immunol.* **1992**, 29, 641-650.
- [33] *Humoral Immunity against a Tandem Repeat Epitope of Human Mucin MUC-1 in Sera from Breast, Pancreatic, and Colon Cancer Patients*, Y. Kotera, J. D. Fontenot, et al., *Cancer Res.* **1994**, 54, 2856-2860.
- [34] *Tumor-Associated Carbohydrate Antigens*, S.-I. Hakomori, *Annu. Rev. Immunol.* **1984**, 2, 103-126.
- [35] *O-Linked Glycosylation in the Mammary Gland: Changes that Occur During Malignancy*, J. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, 6, 355-364.
- [36] *Structures of neutral O-linked polylactosaminoglycans on human skim milk mucins. A novel type of linearly extended poly-N-acetyllactosamine backbones with Gal beta(1-4)GlcNAc beta(1-6) repeating units*, F. G. Hanisch, G. Uhlenbruck, et al., *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 872-883.
- [37] *Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions*, I. Brockhausen, *EMBO Rep* **2006**, 7, 599-604.
- [38] *Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells*, I. Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1999**, 1473, 67-95.
- [39] *Recombinant MUC1 Probe Authentically Reflects Cell-specific O-Glycosylation Profiles of Endogenous Breast Cancer Mucin: HIGH DENSITY AND PREVALENT CORE 2-BASED GLYCOSYLATION*, S. Müller, F.-G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 26103-26112.
- [40] *Retargeting of Human T Cells to Tumor-Associated MUC1: The Evolution of a Chimeric Antigen Receptor*, S. Wilkie, G. Picco, et al., *J. Immunol.* **2008**, 180, 4901-4909.
- [41] *Mechanisms Underlying Aberrant Glycosylation of MUC1 Mucin in Breast Cancer Cells*, I. Brockhausen, J.-M. Yang, et al., *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 607-617.
- [42] *Over-expression of ST3Gal-I promotes mammary tumorigenesis*, G. Picco, S. Julien, et al., *Glycobiology* **2010**, 20, 1241-1250.
- [43] *Synthetic Glycopeptides from the Mucin Family as Potential Tools for Cancer Immunotherapy*, T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H. Kunz, *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, 6, 491-517.

- [44] *Towards the Development of Antitumor Vaccines: A Synthetic Conjugate of a Tumor-Associated MUC1 Glycopeptide Antigen and a Tetanus Toxin Epitope*, S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40, 366-369.
- [45] *Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens for the development of tumor-selective vaccines*, S. Dziadek, H. Kunz, *Chem. Rec.* **2004**, 3, 308-321.
- [46] *Synthesis of a  $\beta$ -Hexapeptide from (R)-2-Aminomethyl-alkanoic Acids and Structural Investigations*, T. Hintermann, D. Seebach, *Synlett* **1997**, 1997, 437-438.
- [47] *Rekombinante Antikörper gegen tumorassoziiertes MUC1*, L. Toleikis, Ruprecht-Karls-Universität (Heidelberg), **2003**.
- [48] *Summary Report on the ISOBM TD-4 Workshop: Analysis of 56 Monoclonal Antibodies against the MUC1 Mucin*, M. R. Price, P. D. Rye, et al., *Tumor Biol* **1998**, 19(suppl 1), 1-20.
- [49] *MUC1 and cancer*, J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1999**, 1455, 301-313.
- [50] *Human MUC1 mucin: A multifaceted glycoprotein*, S. von Mensdorff-Pouilly, F. G. M. Snijdwint, et al., *Int. J. Biol. Markers* **2000**, 15, 343.
- [51] *Tumorkvakzine: Immuntherapie im Jahr 2000*, T. Pfitzner, S. Barth, A. Engert, *Der Onkologe* **2000**, 6, S31-S35.
- [52] *Synthese von Tn und T-Antigenanaloga aus beta3-Homothreonin und beta3-Homoserin*, F. Karch, Diplom thesis, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2009**.
- [53] *Tumorkvakzine und aktiv spezifische Immuntherapie*, V. Schirmmacher, *Der Internist* **1997**, 38, 1050-1054.
- [54] *Synthetic Antitumor Vaccines from Tetanus Toxoid Conjugates of MUC1 Glycopeptides with the Thomsen–Friedenreich Antigen and a Fluorine-Substituted Analogue*, A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, 49, 8498-8503.
- [55] *A Fully Synthetic Vaccine Consisting of a Tumor-Associated Glycopeptide Antigen and a T-Cell Epitope for the Induction of a Highly Specific Humoral Immune Response*, S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 7630-7635.
- [56] *Synthetic Vaccines Consisting of Tumor-Associated MUC1 Glycopeptide Antigens and Bovine Serum Albumin*, S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 7624-7630.
- [57] *Immunization of High-Risk Breast Cancer Patients with Clustered sTn-KLH Conjugate plus the Immunologic Adjuvant QS-21*, T. A. Gilewski, G. Ragupathi, et al., *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 2977-2985.
- [58] *Phase III Multicenter Clinical Trial of the Sialyl-TN (STn)-Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) Vaccine for Metastatic Breast Cancer*, D. Miles, H. Roché, et al., *The Oncologist* **2011**, 16, 1092-1100.
- [59] *Effect of Glycosylation on MUC1 Humoral Immune Recognition: NMR Studies of MUC1 Glycopeptide–Antibody Interactions†*, J. S. Grinstead, R. R. Koganty, et al., *Biochemistry* **2002**, 41, 9946-9961.
- [60] *Structural and dynamic consequences of increasing repeats in a MUC1 peptide tumor antigen*, J. T. Schuman, J. S. Grinstead, V. Apostolopoulos, A. P. Campbell, *Biopolymers* **2005**, 77, 107-120.
- [61] *A Synthetic Vaccine Consisting of a Tumor-Associated Sialyl-TN-MUC1 Tandem-Repeat Glycopeptide and Tetanus Toxoid: Induction of a Strong and Highly Selective Immune Response*, A. Kaiser, N. Gaidzik, et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48, 7551-7555.
- [62] *Ein synthetischer Impfstoff aus einem tumorassoziierten Sialyl-TN-MUC1-Tandem-Repeat-Glycopeptid und Tetanustoxoid zur Induktion einer starken, hochselektiven Immunantwort*, A. Kaiser, N. Gaidzik, et al., *Angew. Chem.* **2009**, 121, 7688-7692.
- [63] *Development of polycystic ovaries in rats actively immunised against T-3-BSA*, S. G. Hillier, G. V. Groom, A. R. Boyns, E. H. D. Cameron, *Nature* **1974**, 250, 433-434.

- [64] *Effect of active immunisation against testosterone-3-bsa on circulating levels of testosterone, lh, prolactin and testosterone antibody titre in the male rat*, S. G. Hillier, E. N. Cole, et al., *Steroids* **1973**, 22, 227-238.
- [65] *Synthesis of glycopeptides with the TN and T antigen structures, and their coupling to bovine serum albumin*, H. Kunz, S. Birnbach, P. Wernig, *Carbohydr. Res.* **1990**, 202, 207-223.
- [66] *The role of the Thomsen-Riesenreich antigen as tumor-associated molecule*, W. Dippold, A. Steinborn, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, *Environment Health Perspective* **1990**, 88, 255-257.
- [67] *Artificial Salmonella vaccines: Salmonella typhimurium O-antigen-specific oligosaccharide-protein conjugates elicit opsonizing antibodies that enhance phagocytosis*, H. J. Jörbeck, S. B. Svenson, A. A. Lindberg, *Infect. Immun.* **1981**, 32, 497-502.
- [68] *Active Immunization of Human Ovarian Cancer Patients Against a Common Carcinoma (Thomsen-Friedenreich) Determinant Using a Synthetic Carbohydrate Antigen*, G. D. MacLean, M. B. Bowen-Yacyshyn, et al., *J Immunother* **1992**, 11, 292-305.
- [69] *Augmenting the Immunogenicity of Synthetic MUC1 Peptide Vaccines in Mice*, S. Zhang, L. A. Graeber, et al., *Cancer Res.* **1996**, 56, 3315-3319.
- [70] *Preparation of a multiple antigen glycopeptide (MAG) carrying the Tn antigen. A possible approach to a synthetic carbohydrate vaccine*, S. Bay, R. Lo-Man, et al., *The Journal of Peptide Research* **1997**, 49, 620-625.
- [71] A. Vollmar, T. Dingermann, *Immunologie*
- Grundlagen und Wirkstoffe, Vol. 1*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2005**.
- [72] *New synthetic pathways to C-glycosides*, P. H. Gross, *Carbohydr. Polym.* **1998**, 37, 215-217.
- [73] *Recent advances in stereoselective c-glycoside synthesis*, Y. Du, R. J. Linhardt, I. R. Vlahov, *Tetrahedron* **1998**, 54, 9913-9959.
- [74] *Synthesis and Conformational and Biological Aspects of Carbasugars†*, O. Arjona, A. M. Gómez, J. C. López, J. Plumet, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 1919-2036.
- [75] *Recent Advances in the Synthesis of Carbohydrate Mimetics*, D. C. Koester, A. Holkenbrink, D. B. Werz, *Synthesis* **2010**, 2010, 3217-3242.
- [76] *Synthetic Routes to Thiooligosaccharides and Thioglycopeptides*, K. Pachamuthu, R. R. Schmidt, *Chem. Rev.* **2005**, 106, 160-187.
- [77] *Synthesis of an S-linked glycopeptide analog derived from human Tamm-Horsfall glycoprotein*, X. Zhu, T. Haag, R. R. Schmidt, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2.
- [78] *Synthesis of Glycosylthiols and Reactivity Studies*, R. T. Dere, A. Kumar, et al., *J Org Chem* **2011**, 76, 7539-7545.
- [79] *The Conformational Behaviour of Non-Hydrolyzable Lactose Analogues: The Thioglycoside, Carbaglycoside, and Carba-Iminoglycoside Cases*, E. Montero, A. García-Herrero, et al., *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2000, 1945-1952.
- [80] *Conformational differences between Fuc( $\alpha$ 1-3)GlcNAc and its thioglycoside analogue*, B. Aguilera, J. Jiménez-Barbero, A. Fernández-Mayoralas, *Carbohydr. Res.* **1998**, 308, 19-27.
- [81] *Conformational analysis of maltoside heteroanalogues using high-quality NOE data and molecular mechanics calculations. Flexibility as a function of the interglycosidic chalcogen atom*, T. Weimar, U. C. Kreis, J. S. Andrews, B. M. Pinto, *Carbohydr. Res.* **1999**, 315, 222-233.
- [82] *Investigation of the Stability of Thiosialosides toward Hydrolysis by Sialidases Using NMR Spectroscopy*, J. C. Wilson, M. J. Kiefel, D. I. Angus, M. von Itzstein, *Org. Lett.* **1999**, 1, 443-446.
- [83] *Synthesis and Immunostimulating Activity of A Thioglycolipopeptide Glycomimetic As A Potential Anticancer Vaccine Derived From Tn Antigen*, E. Bousquet, A. Spadaro, et al., *J. Carbohydr. Chem.* **2000**, 19, 527-541.
- [84] *Oligosaccharide-Peptide Ligation of Glycosyl Thioliates with Dehydropeptides: Synthesis of S-Linked Mucin-Related Glycopeptide Conjugates*, D. P. Galonić, W. A. van der Donk, D. Y. Gin, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 5997-6006.

- [85] *Thiooligosaccharide Conjugate Vaccines Evoke Antibodies Specific for Native Antigens*, D. R. Bundle, J. R. Rich, et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 7725-7729.
- [86] *Chemical and Chemoenzymatic Synthesis of S-Linked Ganglioside Analogues and Their Protein Conjugates for Use as Immunogens*, J. R. Rich, W. W. Wakarchuk, D. R. Bundle, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 845-858.
- [87] *Synthesis and Immunochemical characterization of S-linked Glycoconjugate Vaccines against Candida albicans*, X. Wu, T. Lipinski, E. Paszkiewicz, D. R. Bundle, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 6474-6482.
- [88] *Verzweigte Zucker, XXVII. Kettenverlängerungen zu langkettigen Sacchariden durch Reaktionen mit dem Dianion des 1,3-Dithian-2-methanols und verwandten Dianionen*, H. Paulsen, K. Roden, V. Sinnwell, P. Luger, *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 1981, 2009-2027.
- [89] *A Highly Stereoselective Synthesis of 1,2-trans-C-Glycosides via Glycosyl Samarium(III) Compounds*, D. Mazéas, T. Skrydstrup, J.-M. Beau, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, 34, 909-912.
- [90] *Conformational Selection in Glycomimetics: Human Galectin-1 Only Recognizes syn-Ψ-Type Conformations of β-1,3-Linked Lactose and Its C-Glycosyl Derivative*, P. Vidal, V. Roldós, et al., *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 14581-14590.
- [91] *Fluorinated Carbohydrates as Lectin Ligands: Biorelevant Sensors with Capacity to Monitor Anomer Affinity in 19F-NMR-Based Inhibitor Screening*, S. André, F. J. Cañada, et al., *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 4354-4364.
- [92] *Synthesis and Conformational Analysis of (α-D-Galactosyl)phenylmethane and α-,β-Difluoromethane Analogues: Interactions with the Plant Lectin Viscumin*, M. Kolympani, M. Fontanella, et al., *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 2861-2873.
- [93] *The solution conformation of C-glycosyl analogues of the sialyl-Tn antigen*, V. García-Aparicio, A. Malapelle, et al., *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 1974-1982.
- [94] *The conformational behaviour and P-selectin inhibition of fluorine-containing sialyl LeX glycomimetics*, J. Perez-Castells, J. J. Hernandez-Gay, et al., *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 1087-1092.
- [95] *First synthesis of a C-glycoside analogue of a tumor-associated carbohydrate antigen employing samarium diiodide promoted C-glycosylation*, D. Urban, T. Skrydstrup, J.-M. Beau, *Chem. Commun.* **1998**.
- [96] *Synthesis of a Carbon-Linked Mimic of the Disaccharide Component of the Tumor-Related SialylTn Antigen*, Z. Abdallah, G. Doisneau, J.-M. Beau, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, 42, 5209-5212.
- [97] *A C-Linked Disaccharide Analogue of Thomsen–Friedenreich Epitope Induces a Strong Immune Response in Mice*, L. Awad, R. Madani, et al., *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 8578-8582.
- [98] *Practical Total Synthesis of the Anti-Influenza Drug GS-4104*, J. C. Rohloff, K. M. Kent, et al., *J Org Chem* **1998**, 63, 4545-4550.
- [99] *Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond*, D. O'Hagan, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 308-319.
- [100] *Potent Fluoro-oligosaccharide Probes of Adhesion in Toxoplasmosis*, S. A. Allman, H. H. Jensen, et al., *ChemBioChem* **2009**, 10, 2522-2529.
- [101] *In vitro ADMET and physicochemical investigations of poly-N-methylated peptides designed to inhibit Aβ aggregation*, P. P. Bose, U. Chatterjee, et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 5896-5902.
- [102] *Fluorine: A new element in protein design*, B. C. Buer, E. N. G. Marsh, *Protein Sci.* **2012**, 21, 453-462.
- [103] *Cross-Strand Interactions of Fluorinated Amino Acids in β-Hairpin Constructs*, G. A. Clark, J. D. Baleja, K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 17912-17921.
- [104] *The World of β- and γ-Peptides Comprised of Homologated Proteinogenic Amino Acids and Other Components*, D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, *Chem. Biodiversity* **2004**, 1, 1111-1239.
- [105] *[small beta]-Amino acid-containing hybrid peptides-new opportunities in peptidomimetics*, M.-I. Aguilar, A. W. Purcell, et al., *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 2884-2890.

- [106]  $\alpha/\beta$ -Peptide foldamers: state of the art, L. A. Pilsl, O. Reiser, *Amino Acids* **2011**, 41, 709-718.
- [107] Peptoid origins, R. N. Zuckermann, *Peptide Science* **2011**, 96, 545-555.
- [108] Peptide and peptoid foldamers in medicinal chemistry, W. S. Horne, *Expert Opinion on Drug Discovery* **2011**, 6, 1247-1262.
- [109] Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide, P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497-1500.
- [110] 'Mixed'  $\beta$ -Peptides: A unique helical secondary structure in solution. Preliminary communication, D. Seebach, K. Gademann, et al., *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 2033-2038.
- [111]  $\beta$ 2-amino acids—syntheses, occurrence in natural products, and components of  $\beta$ -peptides 1,2, G. Lelais, D. Seebach, *Peptide Science* **2004**, 76, 206-243.
- [112] Preparation of  $\beta$ 2-Amino Acid Derivatives ( $\beta$ 2hThr,  $\beta$ 2hTrp,  $\beta$ 2hMet,  $\beta$ 2hPro,  $\beta$ 2hLys, Pyrrolidine-3-carboxylic Acid) by Using DIOZ as Chiral Auxiliary, F. Gessier, L. Schaeffer, et al., *Helv. Chim. Acta* **2005**, 88, 2235-2250.
- [113] Efficient Synthesis of  $\beta$ 2-Amino Acid by Homologation of  $\alpha$ -Amino Acids Involving the Reformatsky Reaction and Mannich-Type Iminium Electrophile, R. Moumne, S. Lavielle, P. Karoyan, *J Org Chem* **2006**, 71, 3332-3334.
- [114] On the preparation of  $\beta$ -amino acids from  $\alpha$ -amino acids using the Arndt-Eistert reaction: Scope, limitations and stereoselectivity. Application to carbohydrate peptidation. Stereoselective  $\alpha$ -alkylations of some  $\beta$ -amino acids, J. Podlech, D. Seebach, *Liebigs Ann. Chem.* **1995**, 1995, 1217-1228.
- [115] Synthesis of Enantiopure N- and C-Protected homo- $\beta$ -Amino Acids by Direct Homologation of  $\alpha$ -Amino Acids ¶, R. Caputo, E. Cassano, L. Longobardo, G. Palumbo, *Tetrahedron* **1995**, 51, 12337-12350.
- [116] Pseudoaxially Disubstituted Cyclo- $\beta$ 3-tetrapeptide Scaffolds, P. W. Sutton, A. Bradley, et al., *Tetrahedron* **2000**, 56, 7947-7958.
- [117] F. v. Nussbaum, P. Spiteller, in *Highlights in Bioorganic Chemistry: Methods and Applications* (Eds.: C. Schmuck, H. Wennemers), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, pp. 63-89.
- [118] Unusual Amino Acids: Synthesis and Introduction into Naturally Occurring Peptides and Biologically Active Analogues, G. Cardillo, L. Gentilucci, A. Tolomelli, *Mini Rev. Med. Chem.* **2006**, 6, 293-304.
- [119] The Proteolytic Stability of 'Designed'  $\beta$ -Peptides Containing  $\alpha$ -Peptide-Bond Mimics and of Mixed  $\alpha,\beta$ -Peptides: Application to the Construction of MHC-Binding Peptides, D. F. Hook, P. Bindschädler, et al., *Chem. Biodiversity* **2005**, 2, 591-632.
- [120] Melanoma Peptide MART-1(27-35) Analogues with Enhanced Binding Capacity to the Human Class I Histocompatibility Molecule HLA-A2 by Introduction of a  $\beta$ -Amino Acid Residue: Implications for Recognition by Tumor-Infiltrating Lymphocytes, G. Guichard, A. Zerbib, et al., *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3803-3808.
- [121] Enantioselective Preparation of beta(2)-Amino Acid Derivatives for beta-Peptide Synthesis, D. Seebach, A. K. Beck, et al., *Synthesis-Stuttgart* **2009**, 1-32.
- [122]  $\beta$ -Peptide Conjugates: Syntheses and CD and NMR Investigations of  $\beta/\alpha$ -Chimeric Peptides, of a DPA- $\beta$ -Decapeptide, and of a PEGylated  $\beta$ -Heptapeptide, J. Gardiner, R. I. Mathad, et al., *Helv. Chim. Acta* **2009**, 92, 2698-2721.
- [123] Glycosylated foldamers: synthesis of carbohydrate-modified  $\beta$ 3hSer and incorporation into  $\beta$ -peptides, A. S. Norgren, T. Norberg, P. I. Arvidsson, *J. Pept. Sci.* **2007**, 13, 717-727.
- [124] Biomolecular recognition of glycosylated  $\beta$ 3-peptides by GalNAc specific lectins, A. S. Norgren, M. Geitmann, U. H. Danielson, P. I. Arvidsson, *J. Mol. Recognit.* **2007**, 20, 132-138.
- [125] Synthesis of glycosylated  $\beta$ 3-homo-threonine conjugates for mucin-like glycopeptide antigen analogues, F. Karch, A. Hoffmann-Röder, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, 6, 47.
- [126] The use of  $\beta$ -amino acids in the design of protease and peptidase inhibitors, D. Steer, R. Lew, et al., *Lett. Pept. Sci.* **2001**, 8, 241-246.

- [127] *Probing the Proteolytic Stability of  $\beta$ -Peptides Containing  $\alpha$ -Fluoro- and  $\alpha$ -Hydroxy- $\beta$ -Amino Acids*, D. F. Hook, F. Gessier, et al., *ChemBioChem* **2004**, 5, 691-706.
- [128] *Synthesis, Structure, and Biological Applications of  $\alpha$ -Fluorinated  $\beta$ -Amino Acids and Derivatives*, T. L. March, M. R. Johnston, P. J. Duggan, J. Gardiner, *Chem. Biodiversity* **2012**, 9, 2410-2441.
- [129] *Fluorinated  $\beta^2$ - and  $\beta^3$ -Amino Acids: Synthesis and Inhibition of  $\alpha$ -Chymotrypsin*, V. Peddie, M. Pietsch, et al., *Synthesis* **2010**, 2010, 1845-1859.
- [130] *100 Years of the Wolff Rearrangement*, W. Kirmse, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2002, 2193-2256.
- [131] *The Wolff Rearrangement of  $\alpha$ -Diazo Carbonyl Compounds*, H. Meier, K.-P. Zeller, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1975**, 14, 32-43.
- [132]  *$\beta$ -peptoid "Foldamers"—Why the additional methylene unit?*, C. A. Olsen, *Peptide Science* **2011**, 96, 561-566.
- [133] *Peptoid–Peptide Hybrid Backbone Architectures*, C. A. Olsen, *ChemBioChem* **2010**, 11, 152-160.
- [134] *Cellular uptake of an [small alpha]-AApeptide*, G. Bai, S. Padhee, et al., *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 1149-1153.
- [135] *[gamma]-AApeptides: design, synthesis and evaluation*, Y. Niu, Y. Hu, et al., *New J. Chem.* **2011**, 35, 542-545.
- [136] *Peptide Nucleic Acids: An Overview*, P. Rathee, D. Rathee, et al., *The Pharma Innovation Journal* **2012**, 1, 25-42.
- [137] *Efficient method for the preparation of peptoids [oligo(*N*-substituted glycines)] by submonomer solid-phase synthesis*, R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, S. B. H. Kent, W. H. Moos, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10646-10647.
- [138] *Peptoids: a modular approach to drug discovery*, R. J. Simon, R. S. Kania, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, 89, 9367-9371.
- [139] *Helices in peptoids of  $\alpha$ - and  $\beta$ -peptides*, B. Carsten, G. Robert, H. Hans-Jörg, *Phys Biol* **2006**, 3, S1.
- [140] *Solid-Phase Synthesis of *N*-Substituted Glycine Oligomers ( $\alpha$ -Peptoids) and Derivatives*, A. S. Culf, R. J. Ouellette, *Molecules* **2010**, 15, 5282-5335.
- [141] *Microwave heating in solid-phase peptide synthesis*, S. L. Pedersen, A. P. Tofteng, L. Malik, K. J. Jensen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 1826-1844.
- [142] *Collagen-Based Structures Containing the Peptoid Residue *N*-Isobutylglycine (Nleu): Conformational Analysis of Gly-Nleu-Pro Sequences by 1H-NMR and Molecular Modeling†*, G. Melacini, Y. Feng, M. Goodman, *Biochemistry* **1997**, 36, 8725-8732.
- [143] *Collagen-Based Structures Containing the Peptoid Residue *N*-Isobutylglycine (Nleu): Synthesis and Biophysical Studies of Gly-Nleu-Pro Sequences by Circular Dichroism and Optical Rotation†*, Y. Feng, G. Melacini, M. Goodman, *Biochemistry* **1997**, 36, 8716-8724.
- [144] *A Template-Induced Incipient Collagen-Like Triple-Helical Structure*, M. Goodman, Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5156-5157.
- [145] *Acetyl-Terminated and Template-Assembled Collagen-Based Polypeptides Composed of Gly-Pro-Hyp Sequences. 2. Synthesis and Conformational Analysis by Circular Dichroism, Ultraviolet Absorbance, and Optical Rotation*, Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10351-10358.
- [146] *Acetyl-Terminated and Template-Assembled Collagen-Based Polypeptides Composed of Gly-Pro-Hyp Sequences. 3. Conformational Analysis by 1H-NMR and Molecular Modeling Studies*, G. Melacini, Y. Feng, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10359-10364.
- [147] *Collagen-Based Structures Containing the Peptoid Residue *N*-Isobutylglycine (Nleu). 6. Conformational Analysis of Gly-Pro-Nleu Sequences by 1H NMR, CD, and Molecular Modeling*, G. Melacini, Y. Feng, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10725-10732.
- [148] *Collagen-based structures containing the peptoid residue *N*-isobutylglycine (Nleu): Synthesis and biophysical studies of Gly-Pro-Nleu sequences by circular*



- dichroism, ultraviolet absorbance, and optical rotation*, Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, M. Goodman, *Biopolymers* **1996**, 39, 859-872.
- [149] *Collagen-Like Triple Helices Incorporating Peptoid Residues†*, M. Goodman, G. Melacini, Y. Feng, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10928-10929.
- [150] *Examples of Peptide–Peptoid Hybrid Serine Protease Inhibitors Based on the Trypsin Inhibitor SFTI-1 with Complete Protease Resistance at the P1□P1' Reactive Site*, M. Stawikowski, R. Stawikowska, et al., *ChemBioChem* **2005**, 6, 1057-1061.
- [151] *Design, Synthesis, and Biological Activities of Potent and Selective Somatostatin Analogues Incorporating Novel Peptoid Residues*, T.-A. Tran, R.-H. Mattern, et al., *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 2679-2685.
- [152] *Conformational Analyses of Somatostatin-Related Cyclic Hexapeptides Containing Peptoid Residues*, R.-H. Mattern, T.-A. Tran, M. Goodman, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 2686-2692.
- [153] *Peptide Nucleic Acids (PNA) in Chemical Biology and Drug Discovery*, P. E. Nielsen, *Chem. Biodiversity* **2010**, 7, 786-804.
- [154] *Identification of [gamma]-AApeptides with potent and broad-spectrum antimicrobial activity*, Y. Niu, S. Padhee, et al., *Chem. Commun.* **2011**, 47, 12197-12199.
- [155] *Cellular Translocation of a γ-AApeptide Mimetic of Tat Peptide*, Y. Niu, G. Bai, et al., *Mol. Pharm.* **2012**, 9, 1529-1534.
- [156] *Regulation of p53 stability by Mdm2*, M. H. G. Kubbutat, S. N. Jones, K. H. Vousden, *Nature* **1997**, 387, 299-303.
- [157] *Design and synthesis of AApeptides: A new class of peptide mimics*, Y. Hu, X. Li, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 1469-1471.
- [158] *Solid-Phase Synthesis of a Sialyl-Tn-Glycoundecapeptide of the MUC1 Repeating Unit*, B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1473-1482.
- [159] *A novel stereoselective synthesis of N-acetyl-α-neuraminosyl-galactose disaccharide derivatives, using anomeric S-glycosyl xanthates*, A. Marra, P. Sinaý, *Carbohydr. Res.* **1990**, 195, 303-308.
- [160] *Stereoselective synthesis of 2-thioglycosides of N-acetylneuraminic acid*, A. Marra, P. Sinaý, *Carbohydr. Res.* **1989**, 187, 35-42.
- [161] S. Keil, Dissertation thesis, Johannes Gutenberg-Universität **2000**.
- [162] *One-Pot Azidochlorination of Glycals*, C. Plattner, M. Höfener, N. Sewald, *Org. Lett.* **2011**, 13, 545-547.
- [163] H. Kunz, in *Preparative Carbohydrate Chemistry* (Ed.: S. Hanessian), New York, **1997**, pp. 265-281.
- [164] *Synthetic O-glycopeptides as model substrates for glycosyltransferases*, M. Schultz, H. Kunz, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 1205-1220.
- [165] *Synthetic Glycopeptides of the Tandem Repeat Sequence of the Epithelial Mucin MUC4 with Tumour-associated Carbohydrate Antigens*, C. Brocke, H. Kunz, *Synlett* **2003**, 2003, 2052-2056.
- [166] *Solid-Phase Synthesis of a Tumor-Associated Sialyl-TN Antigen Glycopeptide with a Partial Sequence of the “Tandem Repeat” of the MUC-1 Mucin*, B. Liebe, H. Kunz, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1997**, 36, 618-621.
- [167] *Untersuchungen an Diazomethanen, XVII. Darstellung und Reaktionen von Diazoessigsäure-tert.-butylester*, E. Müller, H. Huber-Emden, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1962**, 660, 54-59.
- [168] *Synthesis of a New Conformation-Constrained l-Tyrosine Analogue as a Potential Scaffold for SH2 Domain Ligands*, F. Liu, H.-Y. Zha, Z.-J. Yao, *J Org Chem* **2003**, 68, 6679-6684.
- [169] *Rapid Assembly and in Situ Screening of Bidentate Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases*, R. Srinivasan, M. Uttamchandani, S. Q. Yao, *Org. Lett.* **2006**, 8, 713-716.
- [170] *Fullerene Unsymmetrical Bis-Adducts as Models for Novel Peptidomimetics*, D. Milic, M. Prato, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 476-483.
- [171] *Fmoc mediated synthesis of Peptide Nucleic Acids*, S. A. Thomson, J. A. Josey, et al., *Tetrahedron* **1995**, 51, 6179-6194.

- [172] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 3, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [173] M. L. T. Wolfrom, A., in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 2, **1963**, pp. 211-215.
- [174] 2,3-Di-O-methyl-D-fucose. Desoxyzucker, 36. Mitteilung, M. P. Khare, O. Schindler, T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta* **1962**, 45, 1547-1551.
- [175] An Improved Synthesis of 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl Bromide: A Key Component for Synthesis of Glycopeptides and Glycolipids, J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, 13, 129-132.
- [176] The conformational properties of glycosidic linkages, R. U. Lemieux, S. Koto, *Tetrahedron* **1974**, 30, 1933-1944.
- [177] Per-O-acylated glycals (1,4- or 1,5-anhydro-2-deoxylad-1-enitols), L. Somsak, I. Nemeth, *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, 12, 679-684.
- [178] The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal, R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244-1251.
- [179] Untersuchungen zur Glykosidsynthese, VI. Kinetische Untersuchungen zum Mechanismus der Koenigs-Knorr-Reaktion, G. Wulff, G. Röhle, *Chem. Ber.* **1972**, 105, 1122-1132.
- [180] Highly Stereoselective Glycosyl-Chloride-Mediated Synthesis of 2-Deoxyglucosides, V. P. Verma, C.-C. Wang, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 846-851.
- [181] Recent Advances in O-Sialylation, G.-J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4539-4566.
- [182] Efficient sialylation with phosphite as leaving group, T. J. Martin, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 6123-6126.
- [183] .beta.-Sialyl phosphite and phosphoramidite: synthesis and application to the chemoenzymic synthesis of CMP-sialic acid and sialyl oligosaccharides, H. Kondo, Y. Ichikawa, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8748-8750.
- [184] Synthesis of Fluorinated Analogues of Tumor-Associated Carbohydrate and Glycopeptide Antigens, C. Mersch, S. Wagner, A. Hoffmann-Röder, *Synlett* **2009**, 2009, 2167-2171.
- [185] Über synthetische Ketoside der N-Acetyl-d-neuraminsäure, 1. Mitt.: Darstellung einer Reihe durch Neuraminidase spaltbarer Ketoside, P. Meindl, H. Tuppy, *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften* **1965**, 96, 802-815.
- [186] Synthese eines trisaccharides aus N-acetylneuraminsäure und N-acetylactosamin, H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* **1984**, 125, 47-64.
- [187] Studies on Glycosylation of the Mitomycins. Syntheses of 7-N-(4-O-Glycosylphenyl)-9a-methoxy-mitosanes, K. Furuhashi, K. Komiyama, H. Ogura, T. Hata, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, 39, 255-259.
- [188] Studies on Sialic Acids. XIX. Syntheses of Partially O-Acetylated 4-Methylcoumarin-7-yl 5-Acetamido-3, 5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonic Acids, K. Furuhashi, H. Ogura, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 2037-2040.
- [189] Synthesis and conformational studies of 2- $\beta$ -chloro, 2- $\alpha$ -fluoro, and 2- $\beta$ -fluoro derivatives of 2-deoxy-N-acetyl-neuraminic acid, M. N. Sharma, R. Eby, *Carbohydr. Res.* **1984**, 127, 201-210.
- [190] Entwicklung synthetischer Antitumorstoffe basierend auf komplexen tumorassoziierten Glycopeptidkonjugaten aus dem epithelialen Mucin MUC1, Dissertation, S. Dziadek, Ph.D. thesis, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2004**.
- [191] Introduction of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, trichloroethoxycarbonyl, and benzyloxycarbonyl amine protecting groups into O-unprotected hydroxyamino acids using succinimidyl carbonates, A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 976-980.
- [192] Carbodiimides. VIII.1 Observations on the Reactions of Carbodiimides with Acids and Some New Applications in the Synthesis of Phosphoric Acid Esters, M. Smith, J. G. Moffatt, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 6204-6212.
- [193] On the mechanism of carboxyl condensations by carbodiimides, G. Doleschall, K. Lempert, *Tetrahedron Lett.* **1963**, 4, 1195-1199.

- [194] *Darstellung von Carbonsäureestern mittels O-Alkyl-N,N'-dicyclohexylisoharnstoffen*, E. Vowinkel, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 16-22.
- [195] *Ueber einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose*, W. Koenigs, E. Knorr, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1901**, *34*, 957-981.
- [196] *Synthese der glycopeptide O- $\beta$ -d-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -d-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-l-serin und -l-threonin*, H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89-107.
- [197] *Über die Natriumverbindungen der Glucose und die Verseifung der acylierten Zucker*, G. Zemplén, A. Kunz, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1923**, *56*, 1705-1710.
- [198] P. J. Garegg, in *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Vol. Volume 52 (Ed.: H. Derek), Academic Press, **1997**, pp. 179-205.
- [199] *Alkyl sulfenyl triflate as activator in the thioglycoside-mediated formation of  $\beta$ -glycosidic linkages during oligosaccharide synthesis*, F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, c13-c17.
- [200] *A novel promoter for the efficient construction of 1,2-trans linkages in glycoside synthesis, using thioglycosides as glycosyl donors*, P. Fügedi, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1986**, *149*, C9-C12.
- [201] *Iodonium promoted reactions of disarmed thioglycosides*, P. Konradsson, U. E. Udodong, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4313-4316.
- [202] *Iodonium ion promoted reactions at the anomeric centre. II An efficient thioglycoside mediated approach toward the formation of 1,2-trans linked glycosides and glycosidic esters*, G. H. Veeneman, S. H. van Leeuwen, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1331-1334.
- [203] *Reaction of methanesulfenyl bromide with silver 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate in organic solvents*, G. K. Helmkamp, D. C. Owsley, W. M. Barnes, H. N. Cassey, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1635-1638.
- [204] *Exceptionally high yield in glycosylation with sialic acid. Synthesis of a GM3 glycoside*, H. Lönn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115-116.
- [205] *Glycosylation Using Methylthioglycosides of N-Acetylneuraminic Acid and Dimethyl(Methylthio)Sulfonium Triflate*, O. Kanie, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 501-506.
- [206] *Nitriles as Solvents in Glycosylation Reactions: Highly Selective  $\beta$ -Glycoside Synthesis I*, R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, *1990*, 694-696.
- [207] *Stereoselective  $\alpha$ -Sialylation with Sialyl Xanthate and Phenylsulfenyl Triflate as a Promotor*, V. Martichonok, G. M. Whitesides, *J Org Chem* **1996**, *61*, 1702-1706.
- [208] *Biomimetic Synthesis of the Tumor-Associated (2,3)-Sialyl-T Antigen and Its Incorporation into Glycopeptide Antigens from the Mucins MUC1 and MUC4*, S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4150-4162.
- [209] *Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance*, M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-2871.
- [210] *Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments*, M. Karplus, *The Journal of Chemical Physics* **1959**, *30*, 11-15.
- [211] *Über neue synthetische Glucoside*, E. Fischer, B. Helferich, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1911**, *383*, 68-91.
- [212] *Zur Darstellung von Glucosiden aus Acetobromglucose*, B. Helferich, K.-F. Wedemeyer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1949**, *563*, 139-145.
- [213]  *$\alpha$ -Selective Organocatalytic Synthesis of 2-Deoxygalactosides*, E. I. Balmond, D. M. Coe, M. C. Galan, E. M. McGarrigle, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 9152-9155.
- [214] *Acid-free, organocatalytic acetalization*, M. Kotke, P. R. Schreiner, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 434-439.
- [215] *Total synthesis of racemic verrucarol*, R. H. Schlessinger, R. A. Nugent, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1116-1118.
- [216] *Fluorinated Pseudopeptide Analogues of the Neuropeptide 26RFa: Synthesis, Biological, and Structural Studies*, C. Pierry, S. Couve-Bonnaire, et al., *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1620-1633.

- [217] *Synthesis of Fluorine-Labeled Peptide Nucleic Acid Building Blocks as Sensors for the  $^{19}\text{F}$  NMR Spectroscopic Detection of Different Hybridization Modes*, A. Kiviniemi, M. Murtola, P. Ingman, P. Virta, *J Org Chem* **2013**, 78, 5153-5159.
- [218] *Asymmetric synthesis of 4-amino- $\gamma$ -butyrolactones via lithium amide conjugate addition*, E. Abraham, J. W. B. Cooke, et al., *Tetrahedron* **2007**, 63, 5855-5872.
- [219] *Asymmetric synthesis of erythro and threo .alpha.-substituted .beta.-amino esters*, J. M. Hawkins, T. A. Lewis, *J Org Chem* **1994**, 59, 649-652.
- [220] *An asymmetric ammonia synthon for Michael additions*, J. M. Hawkins, T. A. Lewis, *J Org Chem* **1992**, 57, 2114-2121.
- [221] *Force-field modeling of the stereoselective Michael additions of an optically active amine and its lithium amide to acrylates*, K. Rudolf, J. M. Hawkins, R. J. Loncharich, K. N. Houk, *J Org Chem* **1988**, 53, 3879-3882.
- [222] *Asymmetric Michael reactions of 3,5-dihydro-4H-dinaphth[2,1-c:1',2'-e]azepine with methyl crotonate*, J. M. Hawkins, G. C. Fu, *J Org Chem* **1986**, 51, 2820-2822.
- [223] *A Catalytic Enantioselective Aza-Michael Reaction: Novel Protocols for Asymmetric Synthesis of  $\beta$ -Amino Carbonyl Compounds*, L.-W. Xu, C.-G. Xia, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2005, 633-639.
- [224] *Recent advances and applications in asymmetric aza-Michael addition chemistry*, P. R. Krishna, A. Sreeshailam, R. Srinivas, *Tetrahedron* **2009**, 65, 9657-9672.
- [225] *Ueber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsäureäther zu den Aethern ungesättigter Säuren*, A. Michael, *J. Prakt. Chem.* **1894**, 49, 20-25.
- [226] *Ueber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsäureäthern zu den Aethern ungesättigter Säuren*, A. Michael, *J. Prakt. Chem.* **1887**, 35, 349-356.
- [227] *Phosphororganische Verbindungen, XII. Phosphinoxyde als Olefinierungsreagenzien*, L. Horner, H. Hoffmann, H. G. Wippel, *Chem. Ber.* **1958**, 91, 61-63.
- [228] *Ueber einige N-Phosphine und N-Phosphoniumverbindungen*, A. Michaelis, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1898**, 31, 1037-1047.
- [229] *Michaelis-Arbuzov rearrangement*, A. K. Bhattacharya, G. Thyagarajan, *Chem. Rev.* **1981**, 81, 415-430.
- [230] *A. E. Arbuzov*, *J. Russ. Phys. Chem. Soc.* **1906**, 38, 687.
- [231] *Solid-Phase Synthesis of Peptide Isosters by Nucleophilic Reactions with N-Terminal Peptide Aldehydes on a Polar Support Tailored for Solid-Phase Organic Chemistry*, J. Rademann, M. Meldal, K. Bock, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1218-1225.
- [232] *Oxidation of alcohols by "activated" dimethyl sulfoxide. a preparative, steric and mechanistic study*, K. Omura, D. Swern, *Tetrahedron* **1978**, 34, 1651-1660.
- [233] *Enantioselective Synthesis of  $\alpha$ -Fluoro- $\beta$ 3-amino Esters: Synthesis of Enantiopure, Orthogonally Protected  $\alpha$ -Fluoro- $\beta$ 3-lysine*, P. J. Duggan, M. Johnston, T. L. March, *J Org Chem* **2010**, 75, 7365-7372.
- [234] *The development of a Selectfluor®-mediated oxidative Mannich reaction*, M. H. Daniels, J. Hubbs, *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 3543-3546.
- [235] *Umpolung Reactivity of Difluoroenol Silyl Ethers with Amines and Amino Alcohols. Application to the Synthesis of Enantiopure  $\alpha$ -Difluoromethyl Amines and Amino Acids*, F. Huguenot, A. Billac, T. Brigaud, C. Portella, *J Org Chem* **2008**, 73, 2564-2569.
- [236] *Chiral derivatives of Butenafine and Terbinafine: synthesis and antifungal activity*, E. Fuglseth, E. Otterholt, et al., *Tetrahedron* **2009**, 65, 9807-9813.
- [237] *Selectfluor F-TEDA-BF<sub>4</sub> as a Versatile Mediator or Catalyst in Organic Chemistry*, S. Stavber, M. Zupan, *Acta Chim. Slov.* **2005**, 52, 13-26.
- [238] *Selective, Electrophilic Fluorinations Using N-Fluoro-o-benzenedisulfonimide*, F. A. Davis, W. Han, C. K. Murphy, *J Org Chem* **1995**, 60, 4730-4737.
- [239] *Catalytic, Asymmetric Synthesis of the Carbacephem Framework*, P. R. Guzzo, M. J. Miller, *J Org Chem* **1994**, 59, 4862-4867.
- [240] *Einfaches Verfahren zur Veresterung von Carbonsäuren*, B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, 90, 556-557.
- [241] *Solution phase synthesis of potential DNA-binding molecules based on the PNA backbone*, H. Challa, S. A. Woski, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 419-422.

- [242] *HYCRON, an Allylic Anchor for High-Efficiency Solid Phase Synthesis of Protected Peptides and Glycopeptides*, O. Seitz, H. Kunz, *J Org Chem* **1997**, 62, 813-826.
- [243] *Ueber die künstliche Aepfelsäure aus Fumarsäure*, F. Loydl, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1878**, 192, 80-89.
- [244] *Recent developments in the field of oxa-Michael reactions*, C. F. Nising, S. Brase, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 988-999.
- [245] *Linkers and Cleavage Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis and Combinatorial Chemistry*, F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2091-2158.
- [246] *The use of polymer supports in organic synthesis. V. The preparation of monoacetates of symmetrical diols*, T. M. Fyles, C. C. Leznoff, *Can. J. Chem.* **1976**, 54, 935-942.
- [247] *Use of polymers as protecting groups in organic synthesis. II. Protection of primary alcohol functional groups*, J. M. J. Fréchet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, 3055-3056.
- [248] *p-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments*, S.-S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 1328-1333.
- [249] *Suppression of Diketopiperazine Formation in Solid Phase Peptide Synthesis*, K. Suzuki, K. Nitta, N. Endo, *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, 23, 222-224.
- [250] *Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc solid phase peptide synthesis*, S. A. Palasek, Z. J. Cox, J. M. Collins, *J. Pept. Sci.* **2007**, 13, 143-148.
- [251] *9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group*, L. A. Carpino, G. Y. Han, *J Org Chem* **1972**, 37, 3404-3409.
- [252] *9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group*, L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5748-5749.
- [253] *Pmc-protected amino acid esters as substrates in N-alkylamino acid synthesis*, K. Wiśniewski, A. S. Kołodziejczyk, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 483-486.
- [254] *Minimization of tryptophan alkylation following 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis*, C. G. Fields, G. B. Fields, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 6661-6664.
- [255] *The 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant*, L. A. Carpino, H. Shroff, et al., *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7829-7832.
- [256] *1,2-Dimethylindole-3-sulfonyl (MIS) as protecting group for the side chain of arginine*, A. Isidro, D. Latassa, et al., *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 2565-2569.
- [257] *Fragment condensation on solid-phase in the synthesis of an amphiphilic glycopeptide from the homophilic recognition domain of epithelial cadherin 1*, J. Habermann, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4797-4800.
- [258] *O-Glycopeptide Synthesis using 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Protected Synthetic Units*, P. Schultheiss-Reimann, H. Kunz, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1983**, 22, 62-63.
- [259] *Piperidine is preferred to morpholine for Fmoc cleavage in solid phase glycopeptide synthesis as exemplified by preparation of glycopeptides related to HIV gp120 and mucins*, T. Vuljanic, K.-E. Bergquist, et al., *Tetrahedron* **1996**, 52, 7983-8000.
- [260] *Base-induced side reactions in Fmoc-solid phase peptide synthesis: Minimization by use of piperazine as Na-deprotection reagent*, J. Wade, M. Mathieu, M. Macris, G. Tregear, *Let. Pept. Sci.* **2000**, 7, 107-112.
- [261] *Problem of aspartimide formation in Fmoc-based solid-phase peptide synthesis using Dmab group to protect side chain of aspartic acid*, J. Ruczyński, B. Lewandowska, P. Mucha, P. Rekowski, *J. Pept. Sci.* **2008**, 14, 335-341.
- [262] *L'hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium: Un reactif de couplage peptidique nouveau et efficace*, V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 1269-1272.

- [263] *O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate as Coupling Reagent for the Synthesis of Peptides of Biological Interest*, V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, 1984, 572-574.
- [264] *Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen*, W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798.
- [265] *APPLICATIONS OF PEPTIDE COUPLING REAGENTS -- AN UPDATE*, P. Kvsrg, B. K. H. BanuB, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Research* **2011**, 8, 108-119.
- [266] *Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis*, L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201-203.
- [267] *Racemization studies during solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents*, L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2279-2282.
- [268] *1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive*, L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398.
- [269] *Divergent Behavior of Glycosylated Threonine and Serine Derivatives in Solid Phase Peptide Synthesis*, Y. Zhang, S. M. Muthana, J. J. Barchi, J. C. Gildersleeve, *Org. Lett.* **2012**, 14, 3958-3961.
- [270] *Enhanced Epimerization of Glycosylated Amino Acids During Solid-Phase Peptide Synthesis*, Y. Zhang, S. M. Muthana, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 6316-6325.
- [271] *Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis*, D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2739-2742.
- [272] *p-Cresol As a Reversible Acylium Ion Scavenger in Solid-Phase Peptide Synthesis*, L. P. Miranda, A. Jones, W. D. F. Meutermans, P. F. Alewood, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1410-1420.
- [273] F. Dick, in *Methods Mol Biol*, Vol. 35 (Eds.: M. W. Pennington, B. M. Dunn), Humana Press Inc, Totowa, NJ, **1994**.
- [274] *On choosing the right ether for peptide precipitation after acid cleavage*, B. G. de La Torre, D. Andreu, *J. Pept. Sci.* **2008**, 14, 360-363.
- [275] *Kontrollierte systemische Freisetzung therapeutischer Peptide aus PEGylierten Prodrugs durch Serumproteasen*, F. I. Nollmann, T. Goldbach, N. Berthold, R. Hoffmann, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 7747-7750.
- [276] *PeptideCutter* **2013**, 20.08.2013, [http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/)
- [277] *Comparative structural analysis of 5,6,7,9-tetra-O-acetyl-4,8-anhydro-1,3-dideoxy-d-glycero-l-glucos-6-amine and its 1-O-acetylated analog, 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-β-d-galactopyranose using X-ray crystallography*, R. Kumar, P. Tiwari, P. R. Maulik, A. K. Misra, *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 2335-2339.
- [278] *Über Schwefelsäure-Verbindungen der Zucker, II. Mitteil.: Eine Reaktion zur Unterscheidung ring-isomerer acylierter Halogenzucker*, H. Ohle, W. Marecek, W. Bourjau, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1929**, 62, 833-854.
- [279] *Probing Bacterial-Toxin Inhibition with Synthetic Glycopolymers Prepared by Tandem Post-Polymerization Modification: Role of Linker Length and Carbohydrate Density*, S.-J. Richards, M. W. Jones, et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 7812-7816.
- [280] *Synthesis of Trisaccharides by Hetero-Diels-Alder Welding of Two Monosaccharide Units*, J. A. Himanen, P. M. Pihko, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 3765-3780.
- [281] A. R. Rosenthal, D.; , *Meth. Carbohydr. Chem.* **1963**, 2, 457.
- [282] *Synthese des 2-Desoxy-D-fucose-3-methyläthers und seine Identifizierung mit D-Diginose. Desoxyzucker, 17. Mitteilung*, C. Tamm, T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta* **1948**, 31, 1630-1644.
- [283] *A Convenient, Highly Efficient One-Pot Preparation of Peracetylated Glycals From Reducing Sugars*, B. K. Shull, Z. Wu, M. Koreeda†, *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, 15, 955-964.

- [284] *H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>: Highly Efficient and Reusable Catalyst for per- O -Acetylation of Carbohydrates Under Solvent-Free Conditions*, J. Zhang, B. Zhang, et al., *J. Carbohydr. Chem.* **2011**, 30, 165-177.
- [285] *Synthesis and Conformational Analysis of the T-Antigen Disaccharide ( $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-GalNAc-OMe)*, R. Bukowski, Laura M. Morris, Robert J. Woods, T. Weimar, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2001, 2697-2705.
- [286] *Synthesis of tri- and tetrasaccharide haptens related to the Asialo forms of the gangliosides GM2 and GM1*, S. Sabesan, R. U. Lemieux, *Can. J. Chem.* **1984**, 62, 644-654.
- [287] *Studies on Sialic Acids. IX. : Formation of a 1,7-Lactone Derivative by Direct Acetylation of N-Acetylneuraminic Acid*, 直. 杉山, 啓. 菅井, et al., *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 1147-1152.
- [288] *Approaches to intramolecular sialylation. 1. Synthesis of pseudodisaccharide Neu5Ac-(1-2)-Gal with ester-linked monosaccharide residues*, L. O. Kononov, D. A. Volodin, G. Magnusson, *Russian Chemical Bulletin* **2003**, 52, 1434-1441.
- [289] *Neuraminic Acid and Related Compounds. I. : Syntheses of Biologically Active 4', 7', 8', 9'-Tetra-O-acetyl-sialyl- and Sialyl-( $\alpha$ 2-6)-D-glucosamine-4-phosphate Analogues of Lipid A*, 千. 清水, 潔. 池田, 一. 阿知波, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 1772-1778.
- [290] *Structure-Based Design and Synthesis of C-1- and C-4-Modified Analogs of Zanamivir as Neuraminidase Inhibitors*, E. Feng, W.-J. Shin, et al., *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 671-684.
- [291] *Total Synthesis of Sialic Acid by a Sequential Rhodium-Catalyzed Aziridination and Barbier Allylation of D-Glycal*, R. Lorpithaya, S. B. Suryawanshi, et al., *Angew. Chem.* **2011**, 123, 12260-12263.
- [292] *Efficient Procedure for the Preparation of Oligomer-Free Na-Fmoc Amino Acids*, S. Nowshuddin, M. N. A. Rao, A. R. Reddy, *Synth. Commun.* **2009**, 39, 2022-2031.
- [293] *Lipo  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -hydroxy Acids and O-Linked Glycosides: Building Blocks for Ceramyl and Glycosphingoyl Peptides*, M. M. Palian, R. Polt, *J Org Chem* **2001**, 66, 7178-7183.
- [294] *Synthese von O-Glycopeptid-Sequenzen des N-Terminus von Interleukin-2*, H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 1989, 751-769.
- [295] *Caged Phospho-Amino Acid Building Blocks for Solid-Phase Peptide Synthesis*, D. M. Rothman, M. E. Vazquez, E. M. Vogel, B. Imperiali, *J Org Chem* **2003**, 68, 6795-6798.
- [296] *Site-Specific Incorporation of the Mucin-Type N-Acetylgalactosamine- $\alpha$ -O-threonine into Protein in Escherichia coli*, R. Xu, S. R. Hanson, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15654-15655.
- [297] *Antifreeze glycopeptide analogues: microwave-enhanced synthesis and functional studies*, C. Heggemann, C. Budke, et al., *Amino Acids* **2010**, 38, 213-222.
- [298] *Stereoselective synthesis of O-serinyl/threoninyl-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ - or  $\beta$ -glycosides*, L. Szabó, J. Ramza, C. Langdon, R. Polt, *Carbohydr. Res.* **1995**, 274, 11-28.
- [299] *Synthesis of a Tumor-Associated 2,3-Sialyl-T Glycododecapeptide Antigen from the Tandem Repeat Region of the Mucin MUC1*, S. Dziadek, H. Kunz, *Synlett* **2003**, 2003, 1623-1626.
- [300] *Synthesis of Tn/T Antigen MUC1 Glycopeptide BSA Conjugates and Their Evaluation as Vaccines*, H. Cai, Z.-H. Huang, et al., *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011, 3685-3689.
- [301] *Synthese von Analoga des MUC1 Glycopeptids unter Verwendung von fluorierten Prolinen*, C. Jansen, Master thesis thesis, Ludwig-Maximilians-Universität **2012**.
- [302] *The (2-Phenyl-2-trimethylsilyl)ethyl-(PTMSEL)-Linker in the Synthesis of Glycopeptide Partial Structures of Complex Cell Surface Glycoproteins*, M. Wagner, S. Dziadek, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 6018-6030.
- [303] *Synthesis of sialyl-Tn antigen. Regioselective sialylation of a galactosamine threonine conjugate unblocked in the carbohydrate portion*, B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8777-8778.



- [304] *Experimental and theoretical studies of substituent effects in hydrogen bond based molecular recognition of a zwitterion by substituted arylureas*, C. S. Wilcox, E.-i. Kim, et al., *Tetrahedron* **1995**, 51, 621-634.
- [305] *Lewis Base Catalysis by Thiourea: N-Bromosuccinimide-Mediated Oxidation of Alcohols*, C. B. Tripathi, S. Mukherjee, *J Org Chem* **2012**, 77, 1592-1598.
- [306] *Substrate-Dependent Nonlinear Effects in Proline–Thiourea-Catalyzed Aldol Reactions: Unraveling the Role of the Thiourea Co-Catalyst*, N. El-Hamdouni, X. Companyó, R. Rios, A. Moyano, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 1142-1148.
- [307] *The Preparation of d-Galacturonic Acid from d-Galactose*, H. M. Sell, K. P. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, 60, 1813-1814.
- [308] *A Chiron Approach to Aminocytitols by Petasis-Borono-Mannich Reaction: Formal Synthesis of (+)-Conduramine E and (–)-Conduramine E*, P. Ghosal, A. K. Shaw, *J Org Chem* **2012**, 77, 7627-7632.
- [309] H. G. O. Becker, W. Berger, G. Domschke, *Organikum*, 22. vollständig überarbeitete Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [310] *Preparation of N-Fmoc-Protected  $\beta$ 2- and  $\beta$ 3-Amino Acids and their use as building blocks for the solid-phase synthesis of  $\beta$ -peptides*, G. Guichard, S. Abele, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81, 187-206.
- [311] *Evaluation of fosmidomycin analogs as inhibitors of the Synechocystis sp. PCC6803 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase*, Y.-H. Woo, R. P. M. Fernandes, P. J. Proteau, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 2375-2385.
- [312] *Synthesis and evaluation of cardiac glycoside mimics as potential anticancer drugs*, M. Jensen, S. Schmidt, et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 2407-2417.
- [313] *Asymmetric synthesis of vicinal amino alcohols: xestoaminol C, sphinganine and sphingosine*, E. Abraham, S. G. Davies, et al., *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 1655-1664.
- [314] *Enantioselective synthesis of a versatile 2-isocephem synthon*, J. Aszodi, A. Bonnet, G. Teutsch, *Tetrahedron* **1990**, 46, 1579-1586.
- [315] *Asymmetric Total Synthesis of Taxol*, R. T. Mukaiyama, I. Shiina, et al., *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 121-161.
- [316] *Oxazole Cyclopeptides for Chirality Transfer in C<sub>3</sub>-Symmetric Octahedral Metal Complexes*, Á. Pintér, G. Haberhauer, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2008, 2375-2387.
- [317] *Domino Processes as a Tool for Recovering Substandard Reactions. Synthesis and Use of Nitroacetic Acid Esters and Amides*, N. Scardovi, A. Casalini, F. Peri, P. Righi, *Org. Lett.* **2002**, 4, 965-968.
- [318] *Depsipeptide und Polyesteramide, I. Synthese von  $\omega$ -Hydroxy- und Mercaptocarbonsäure-tert-butylestern*, H. R. Kricheldorf, J. Kaschig, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1976**, 1976, 882-890.
- [319] *Synthesis and Biological Evaluation (in Vitro and in Vivo) of Cyclic Arginine–Glycine–Aspartate (RGD) Peptidomimetic–Paclitaxel Conjugates Targeting Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3*, R. Colombo, M. Mingozzi, et al., *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 10460-10474.
- [320] *Electrostatic Complexation and Photoinduced Electron Transfer between Zn-Cytochrome c and Polyanionic Fullerene Dendrimers*, M. Braun, S. Atalick, et al., *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 3867-3875.
- [321] *Efficient syntheses of core 1, core 2, and core 3 and core 4 building blocks for SPS of mucin O-glycopeptides based on the N-Dts-method*, E. Meinjohanns, M. Meldal, et al., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1996**, 985-993.
- [322] *A Novel Linker Methodology for the Synthesis of Tailored Conjugate Vaccines Composed of Complex Carbohydrate Antigens and Specific TH-Cell Peptide Epitopes*, S. Dziadek, S. Jacques, D. R. Bundle, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 5908-5917.
- [323] *Dendrimers of Vaccines Consisting of Tumor-Associated Glycopeptide Antigens and T Cell Epitope Peptides*, S. Keil, A. Kaiser, F. Syed, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, 2009, 1355-1369.
- [324] *Nanoscale Biomolecular Structures on Self-Assembled Monolayers Generated from Modular Pegylated Disulfides*, L. S. Wong, S. J. Janusz, et al., *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 12234-12243.

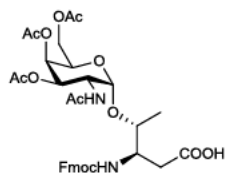
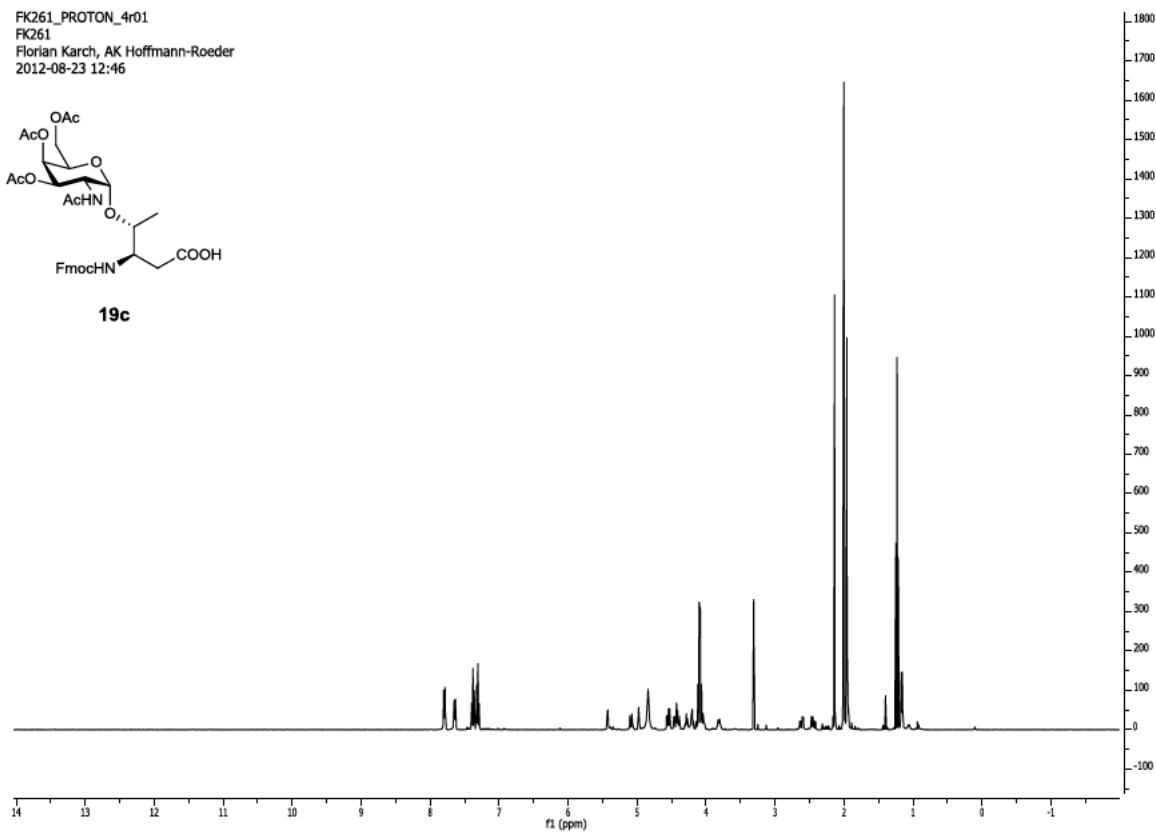




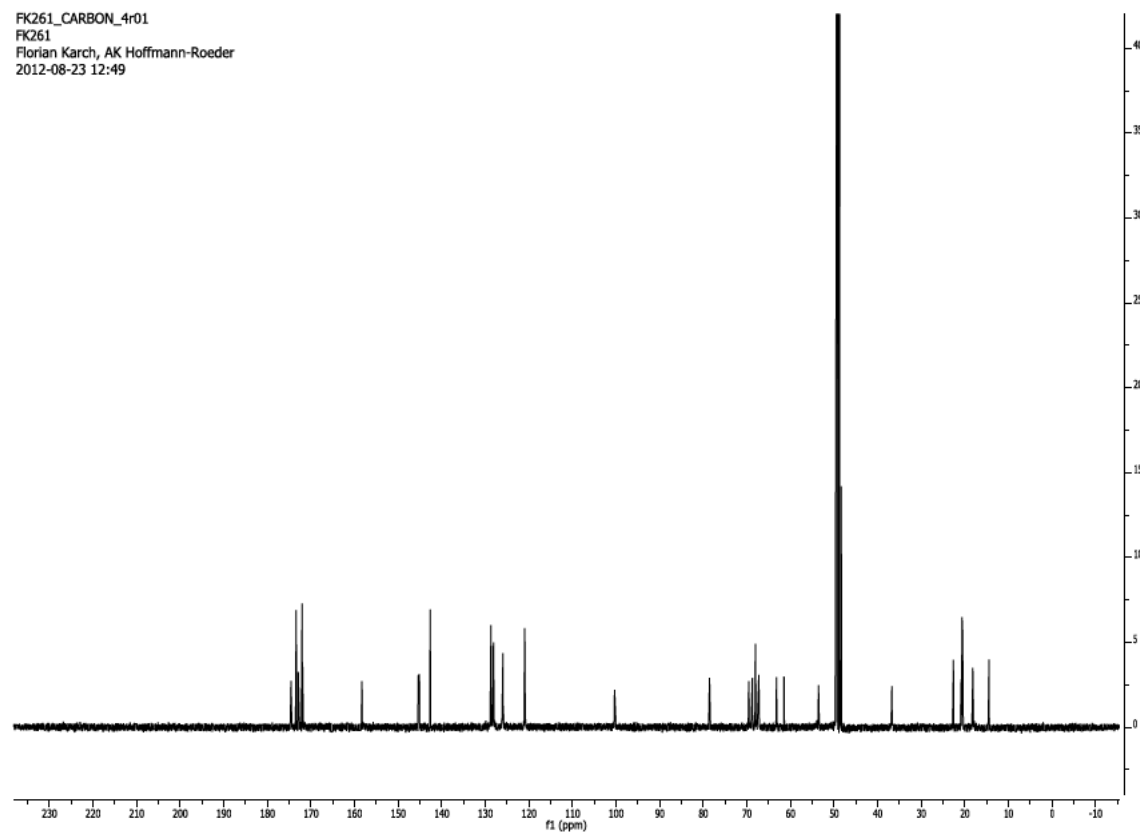


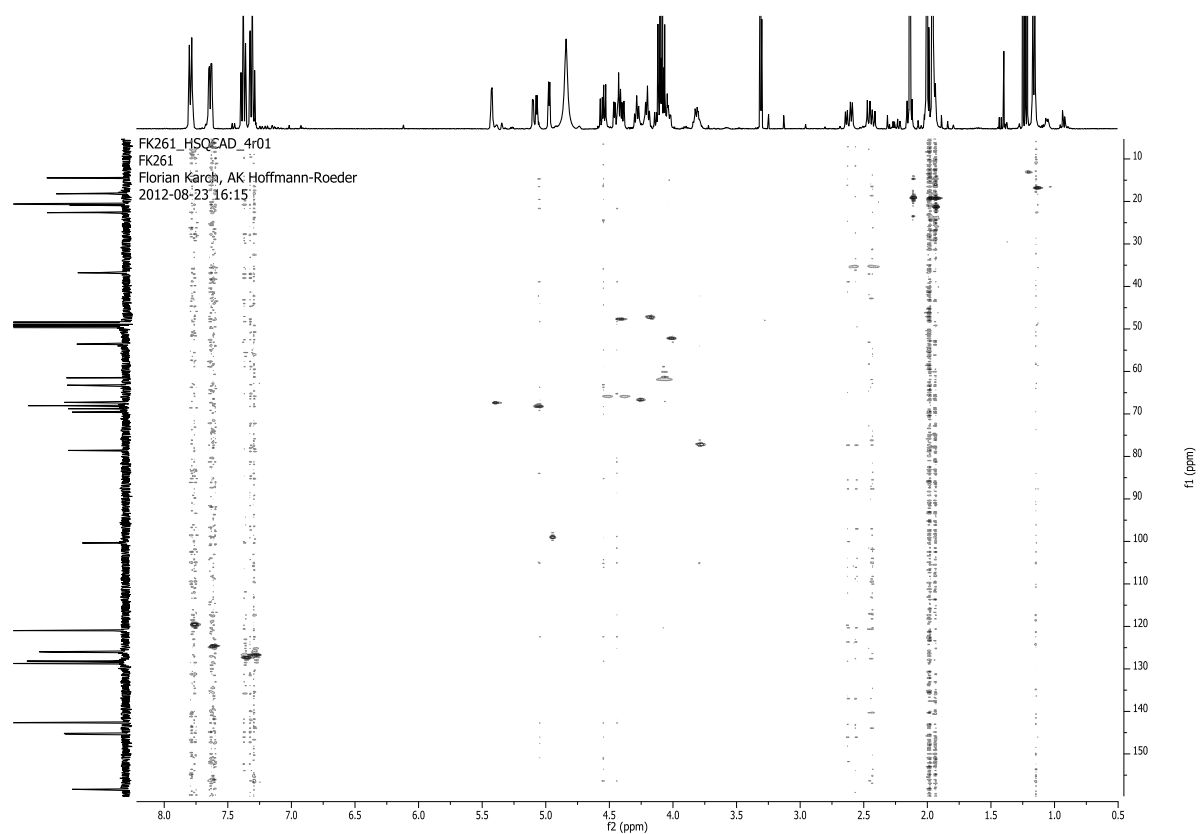
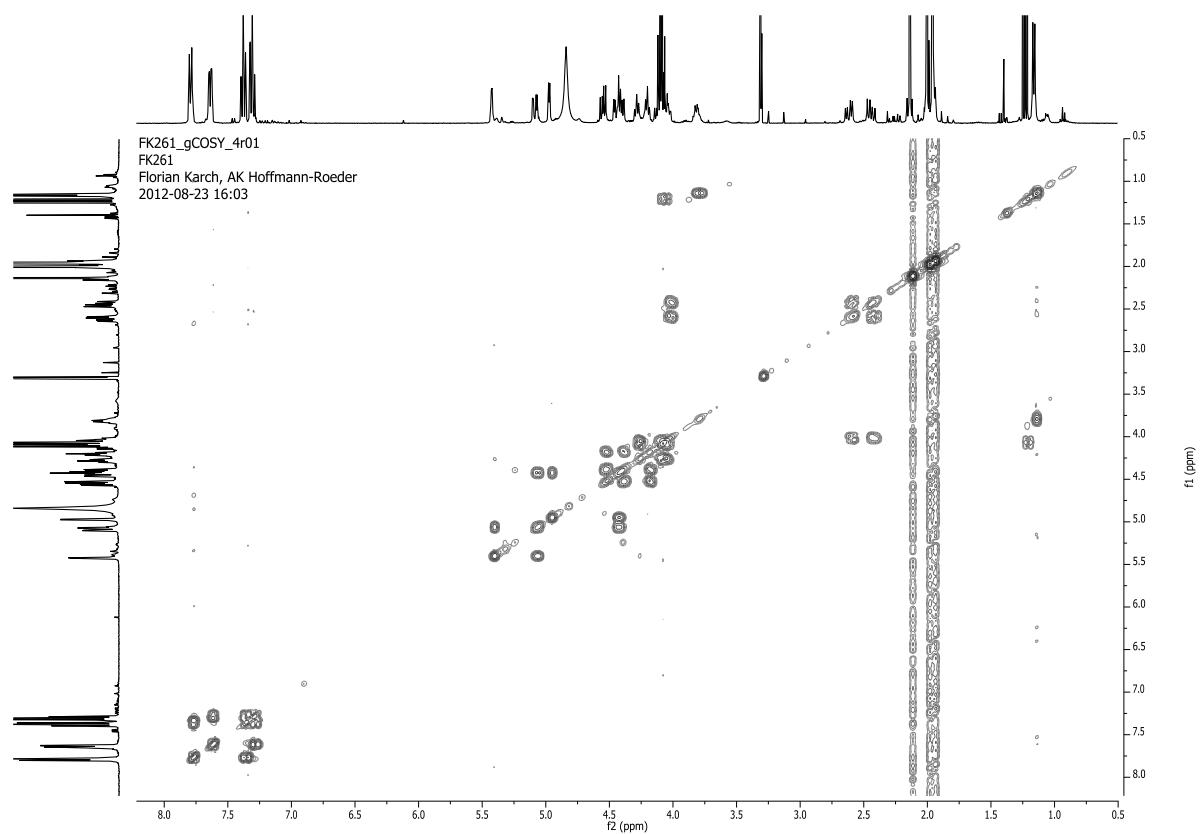
## Spektrenanhang

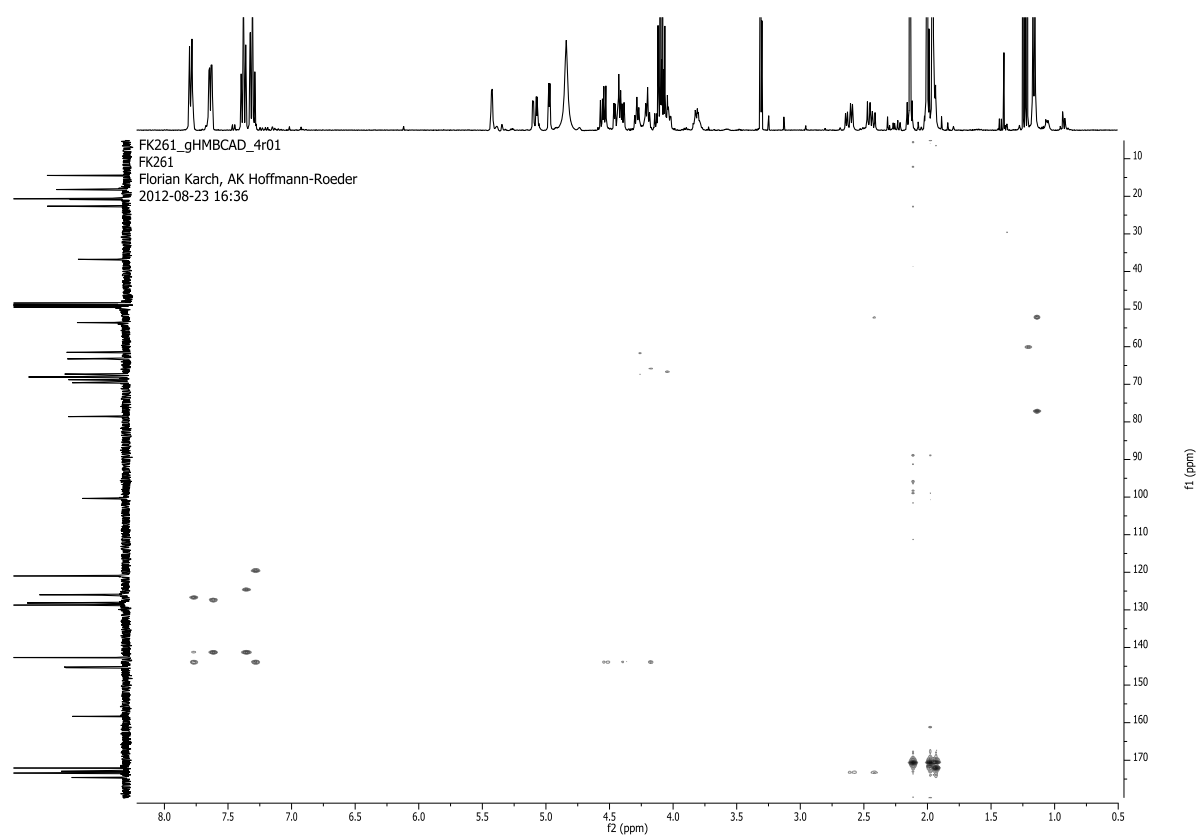
FK261\_PROTON\_4r01  
FK261  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-08-23 12:46

**19c**

FK261\_CARBON\_4r01  
FK261  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-08-23 12:49

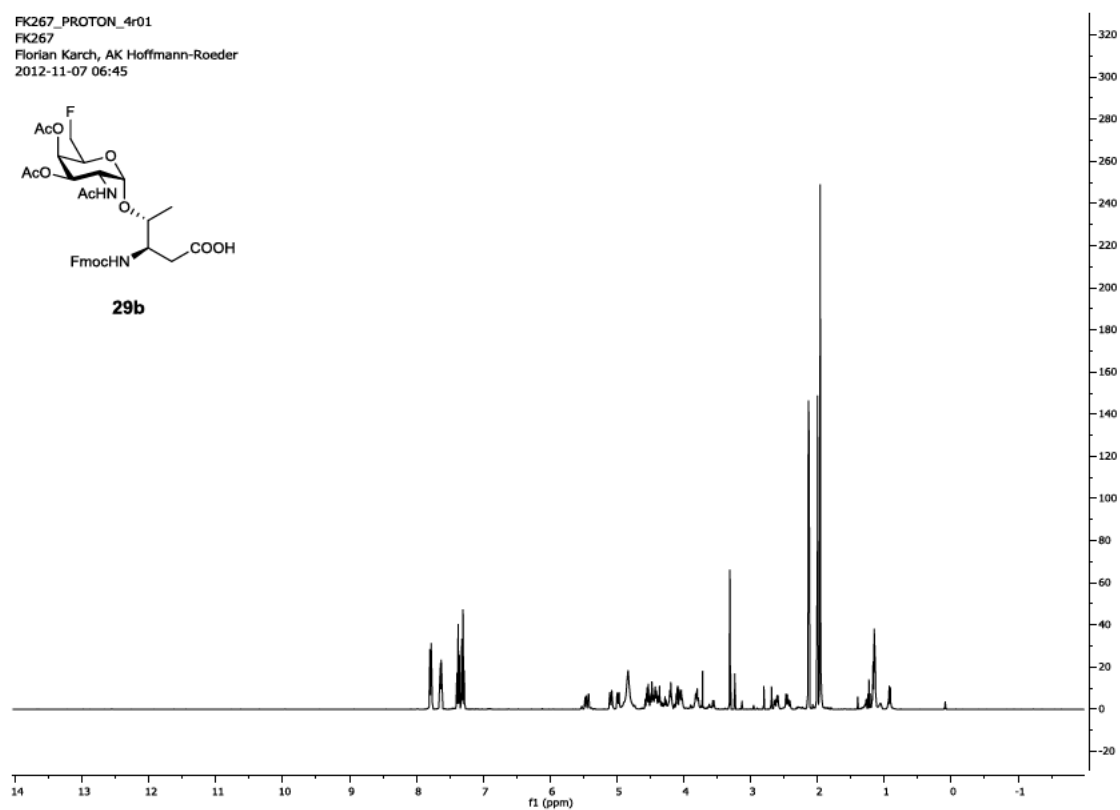
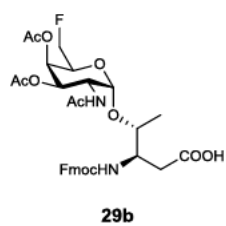




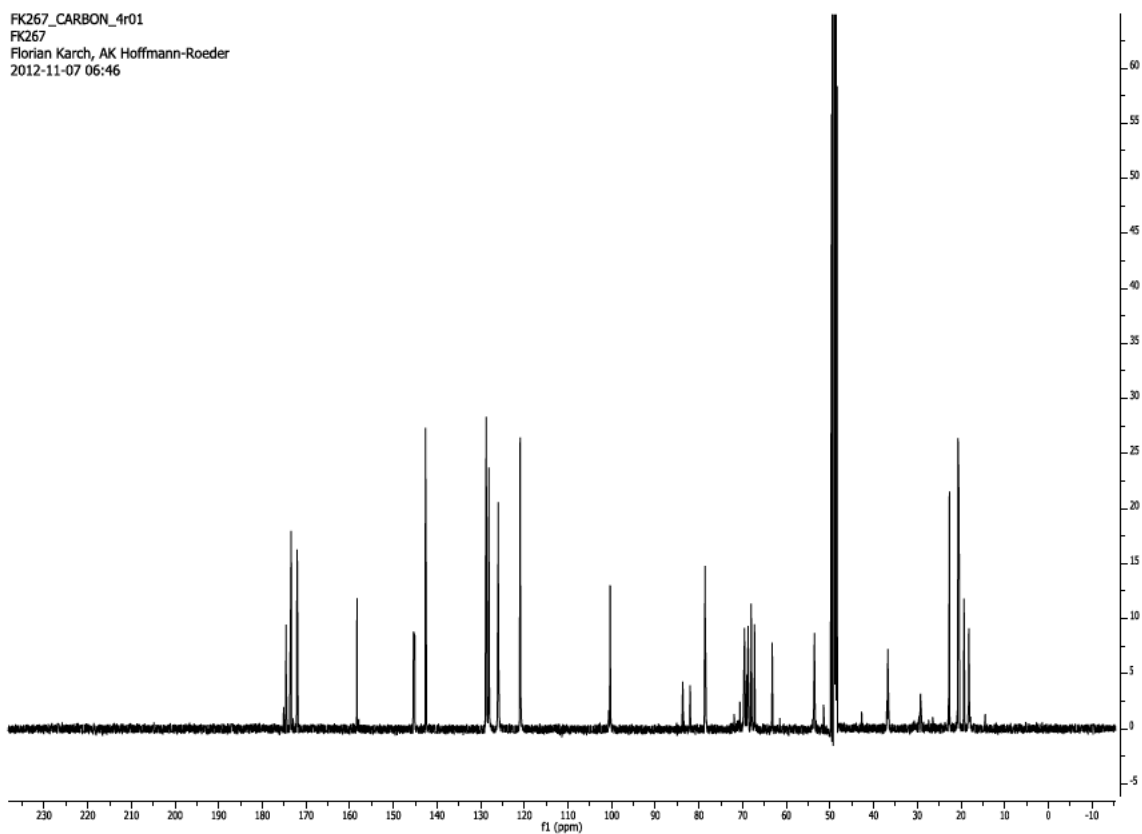




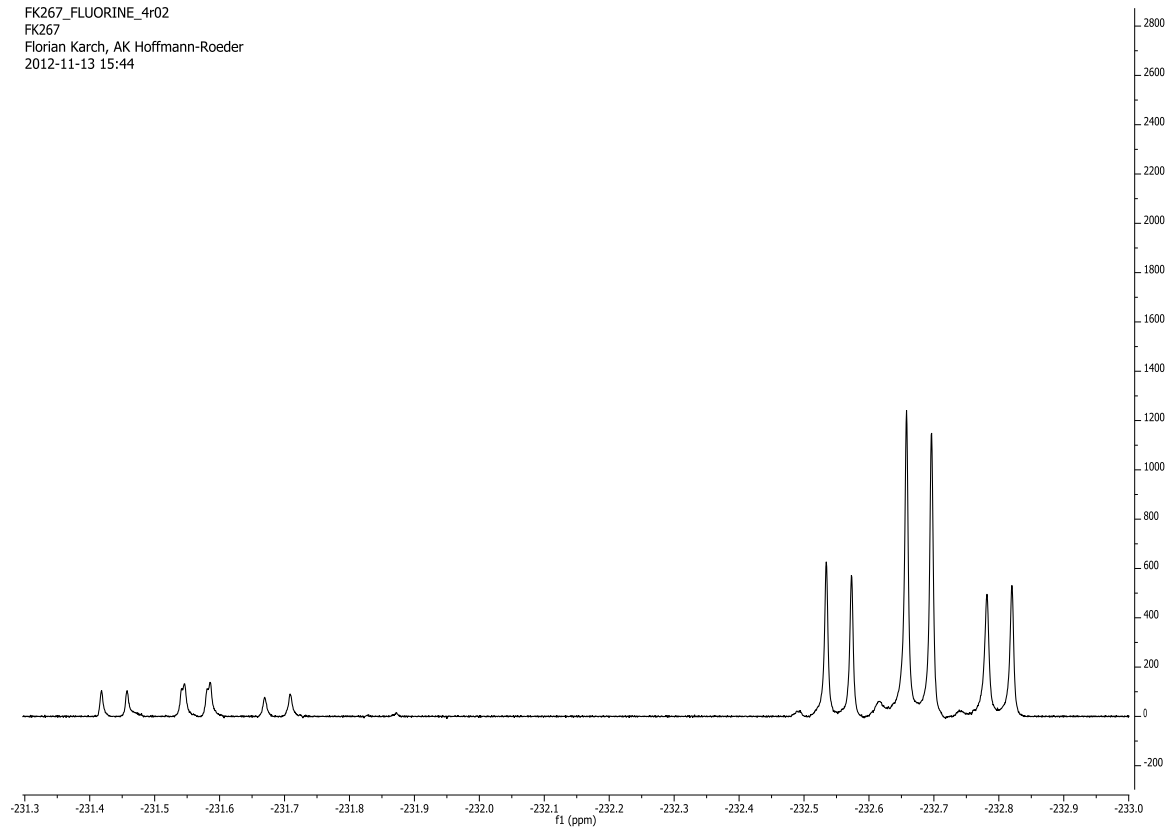
FK267\_PROTON\_4r01  
FK267  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-11-07 06:45



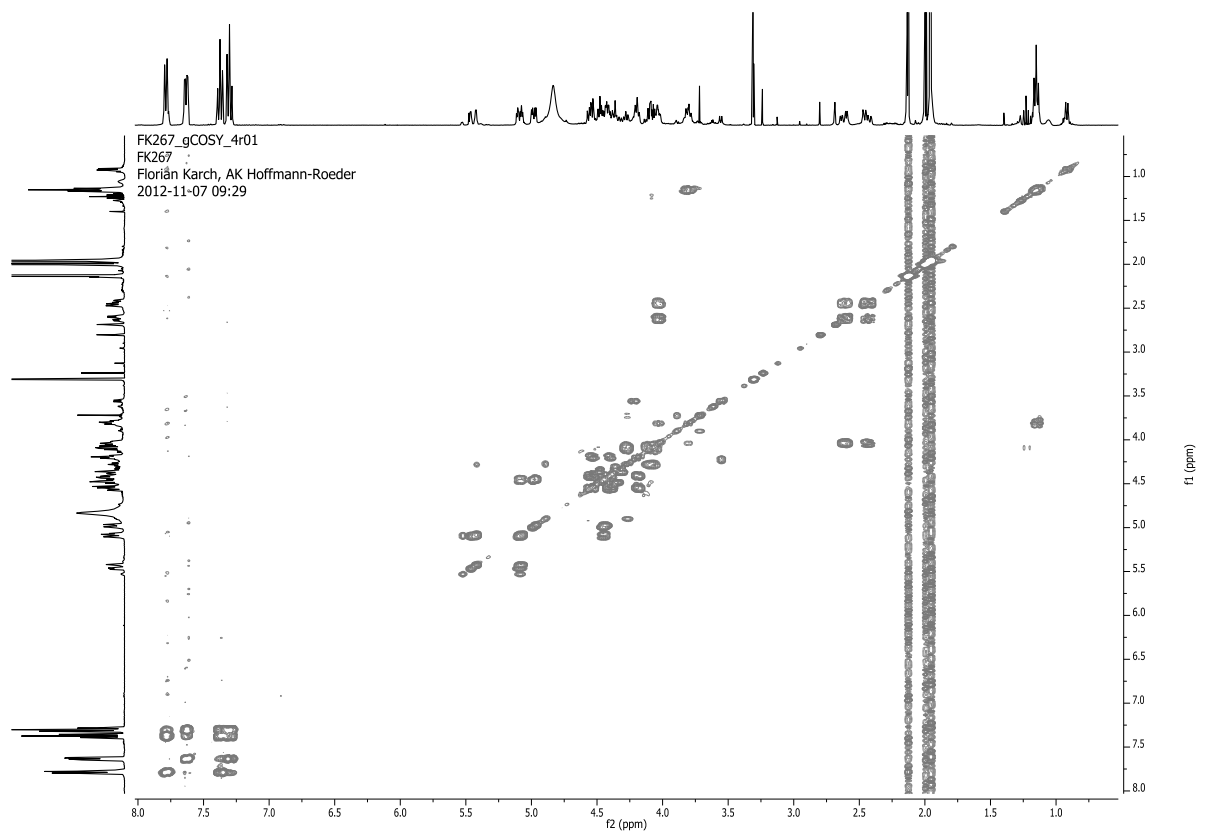
FK267\_CARBON\_4r01  
FK267  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-11-07 06:46

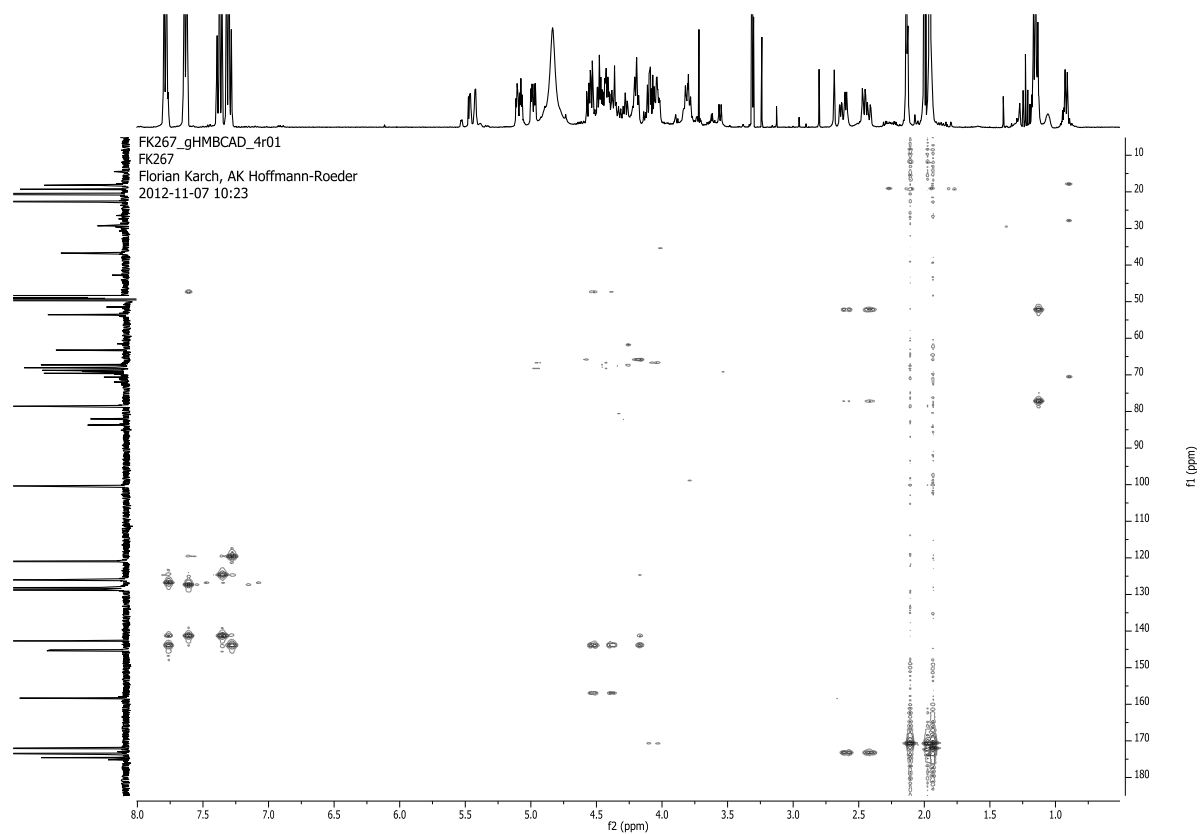
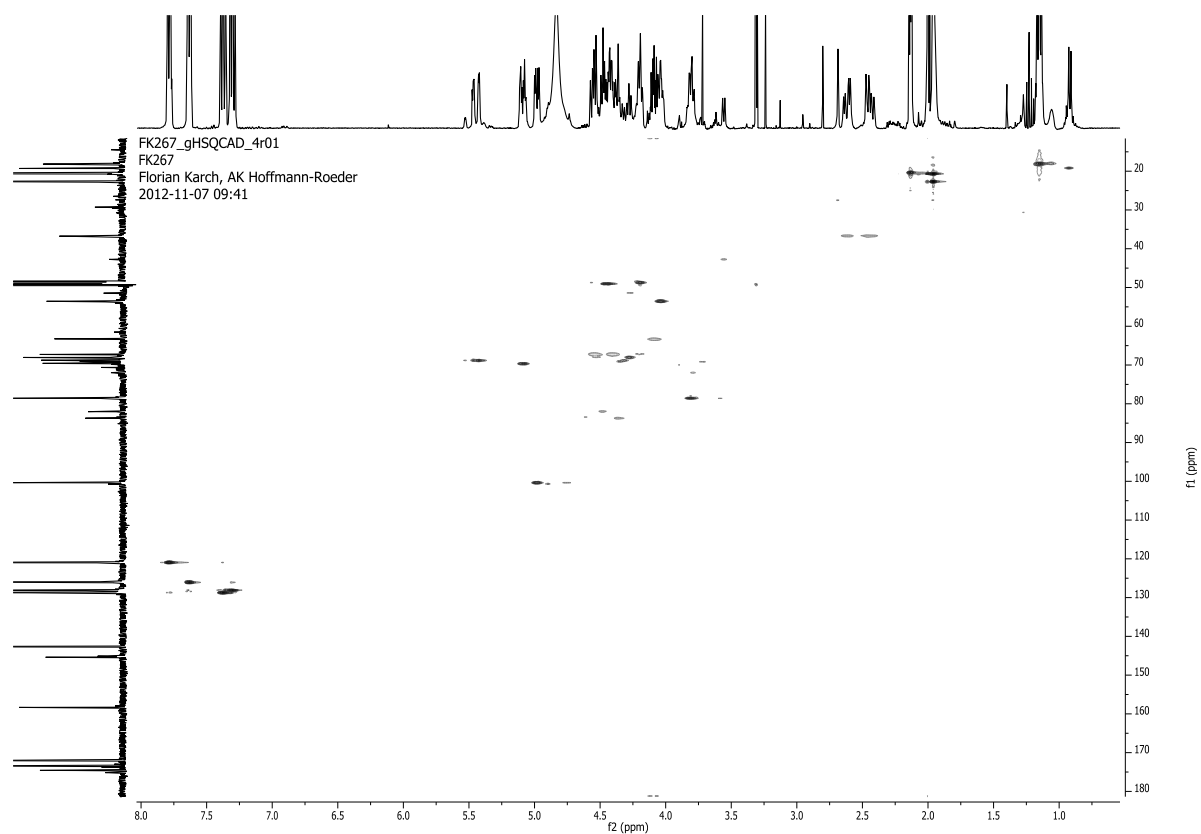


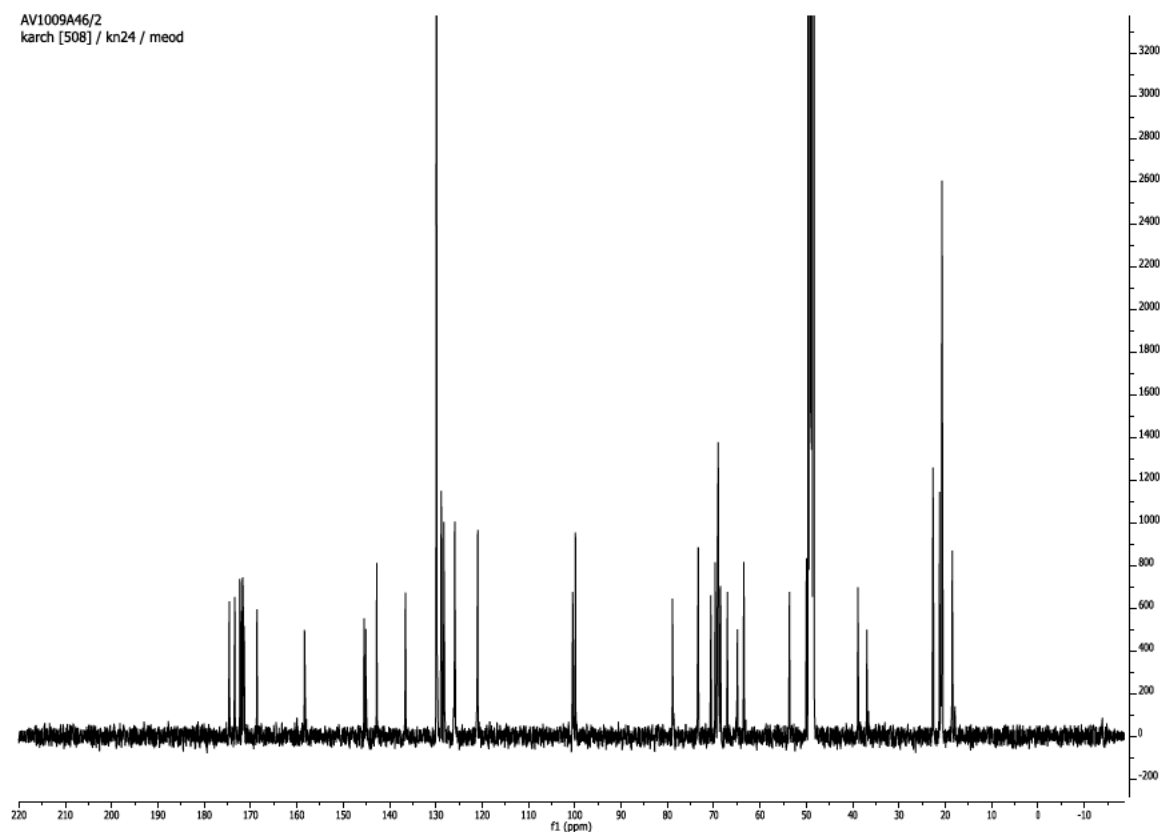
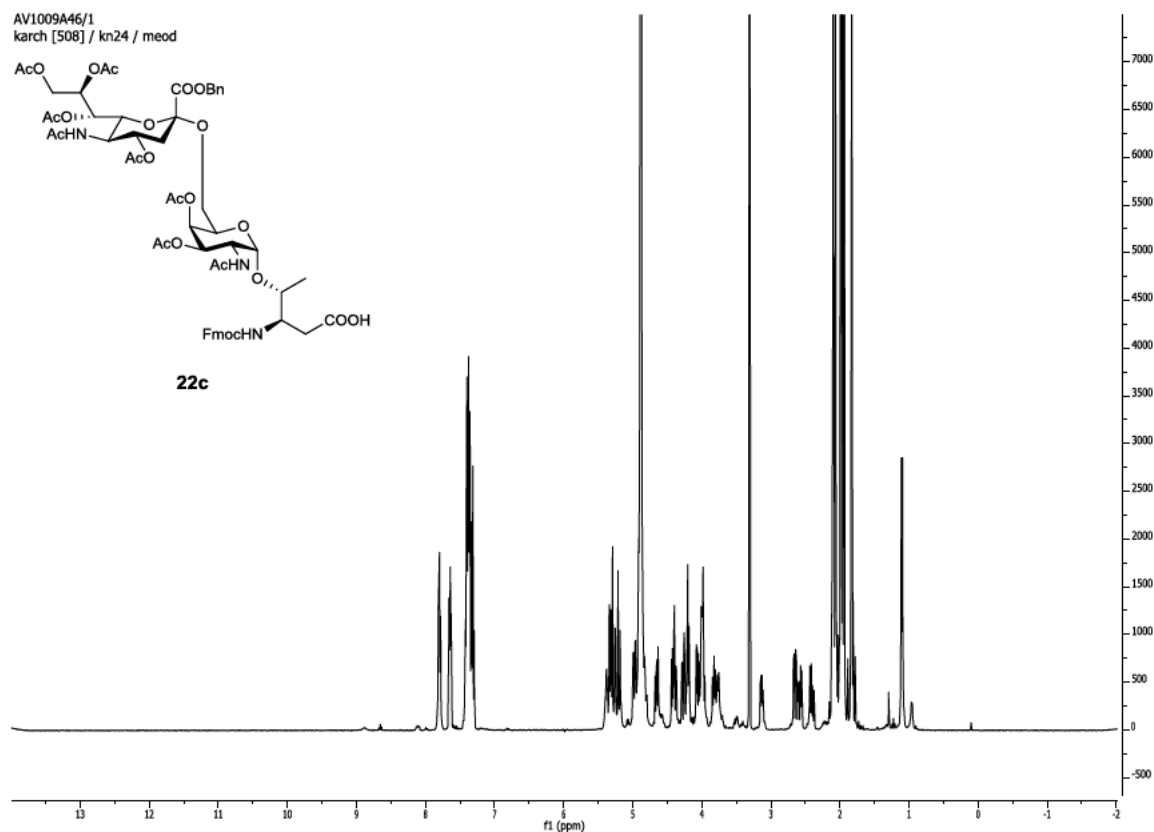
FK267\_FLUORINE\_4r02  
FK267  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-11-13 15:44

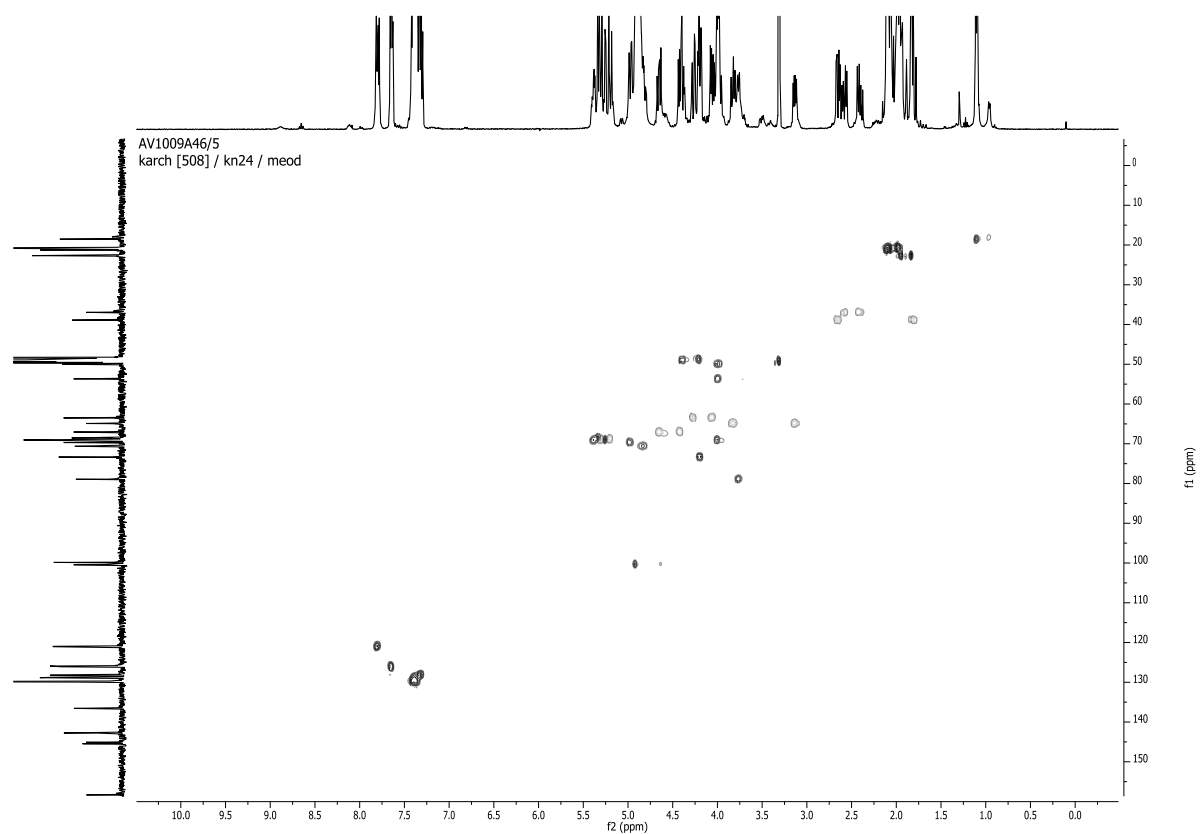
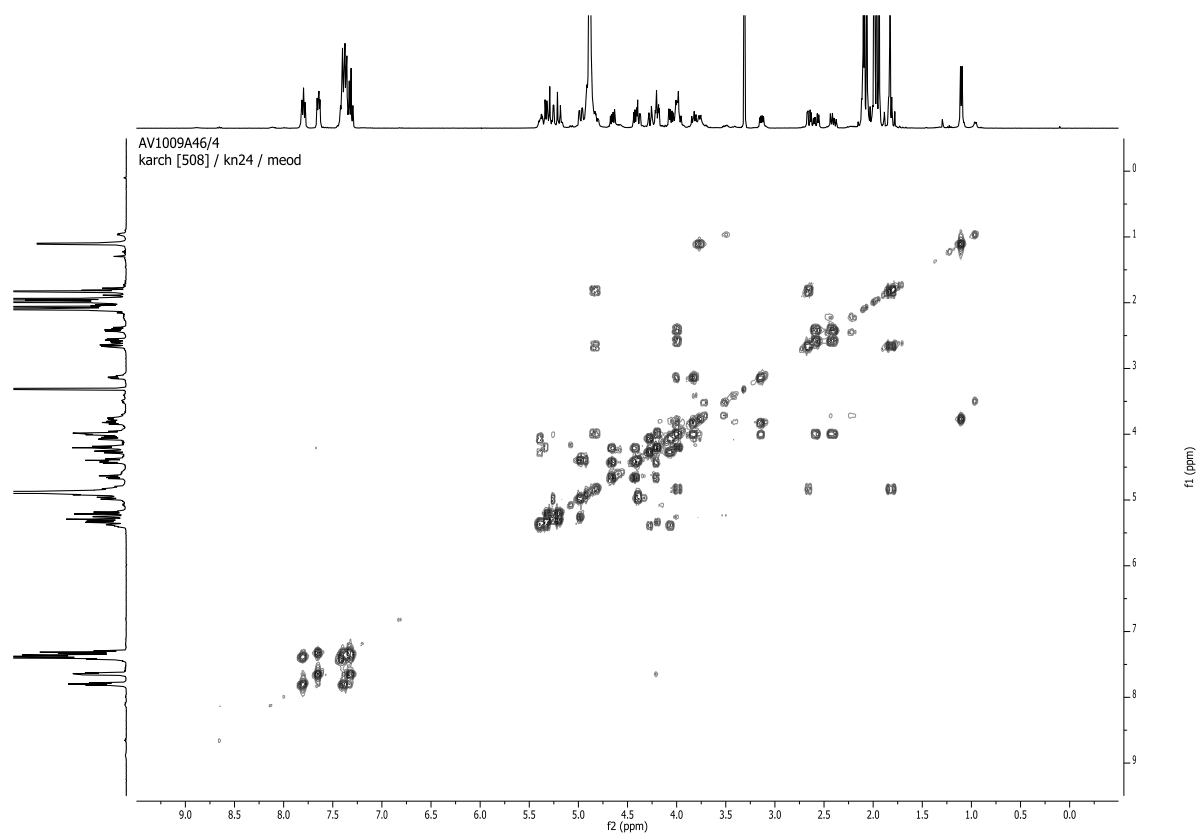


FK267\_gCOSY\_4r01  
FK267  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-11-07 09:29

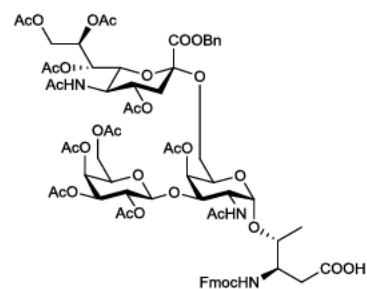




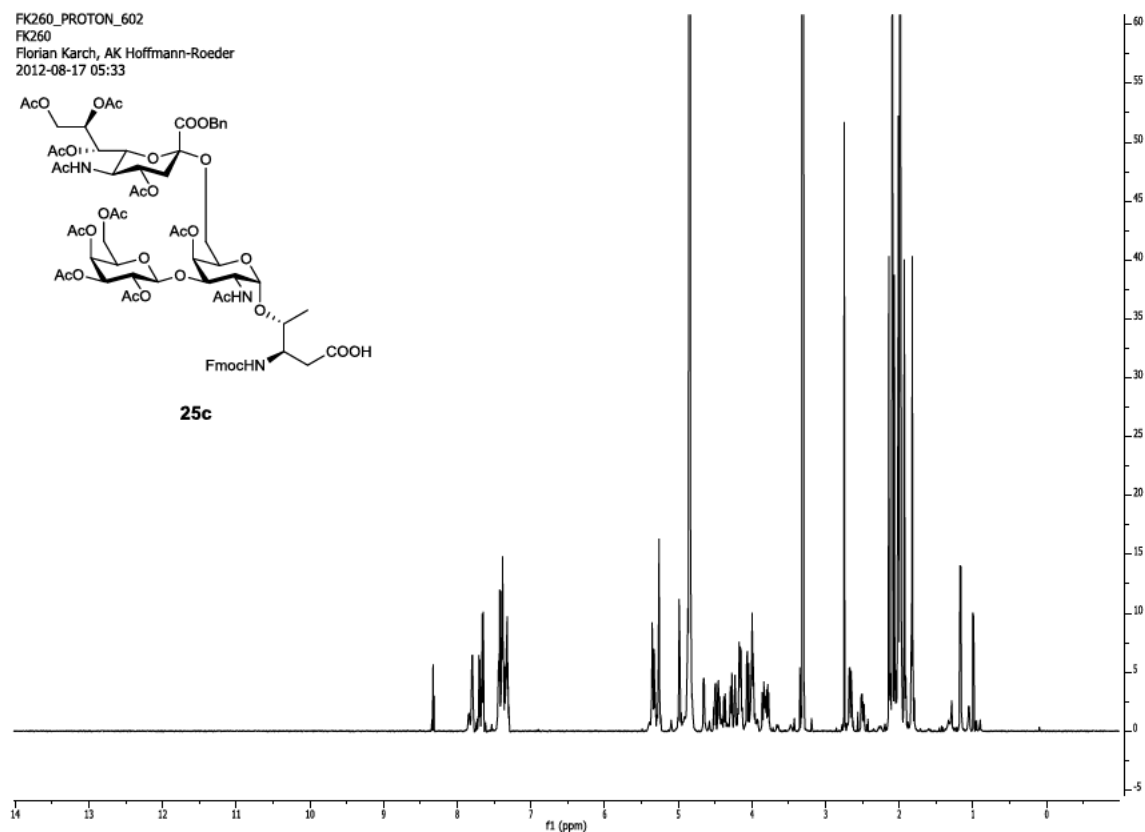




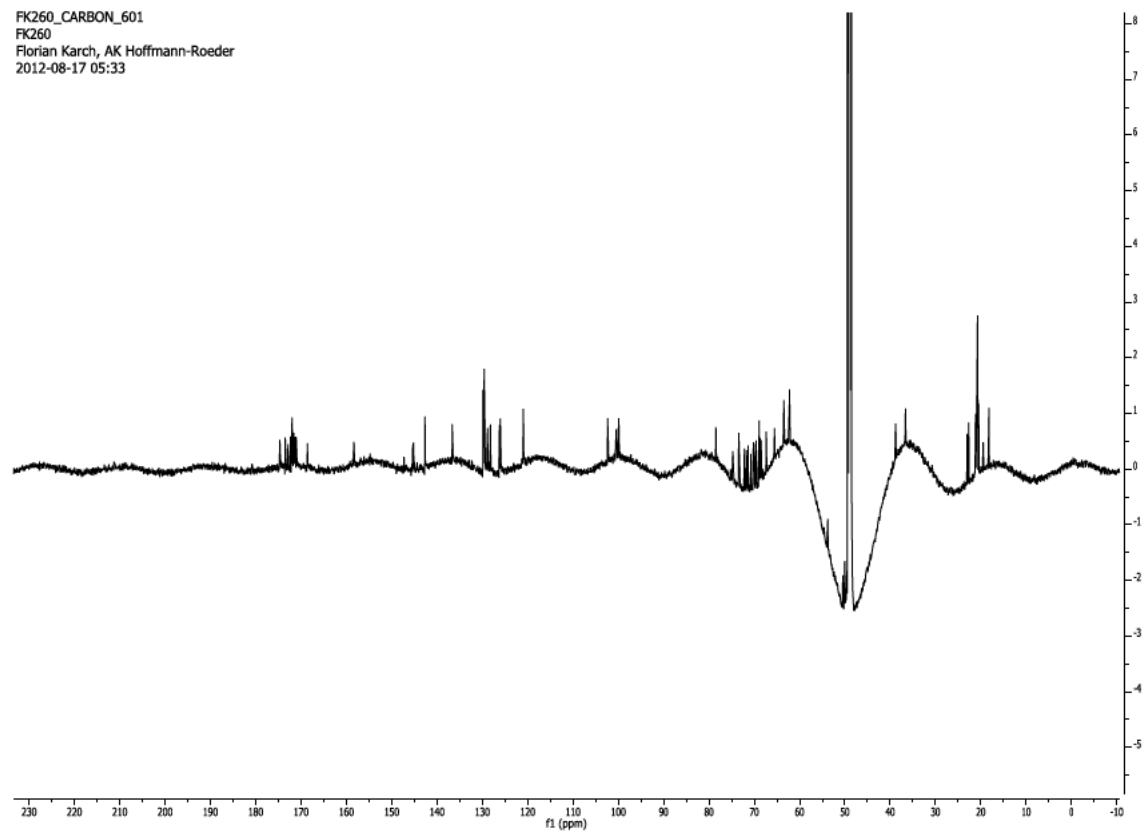
FK260\_PROTON\_602  
FK260  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-08-17 05:33

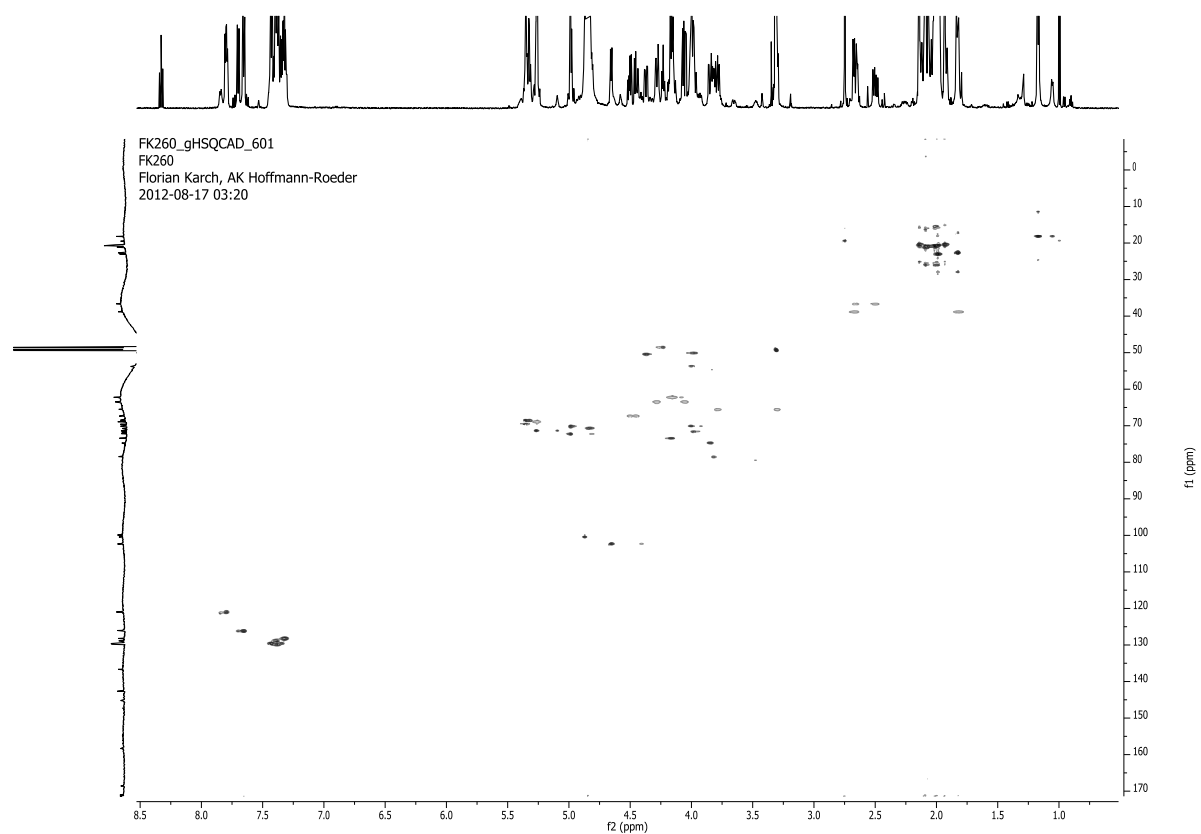
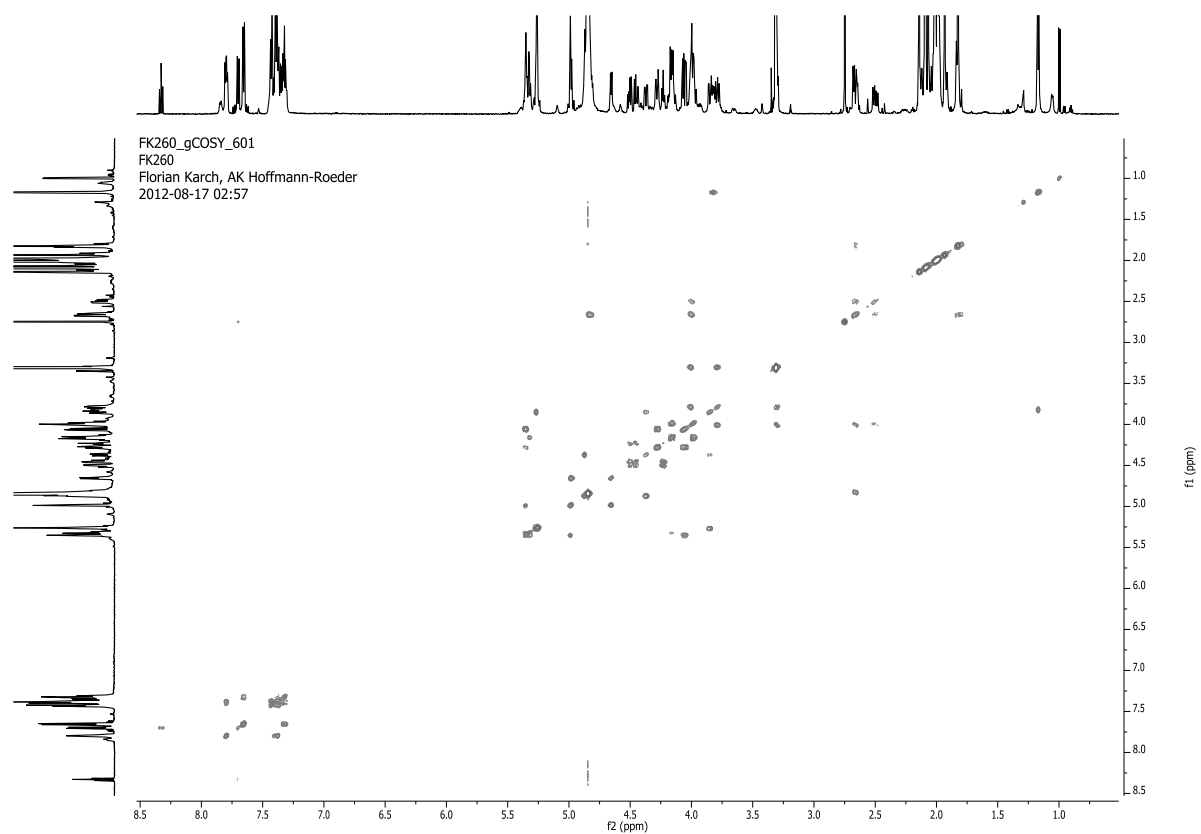


**25c**

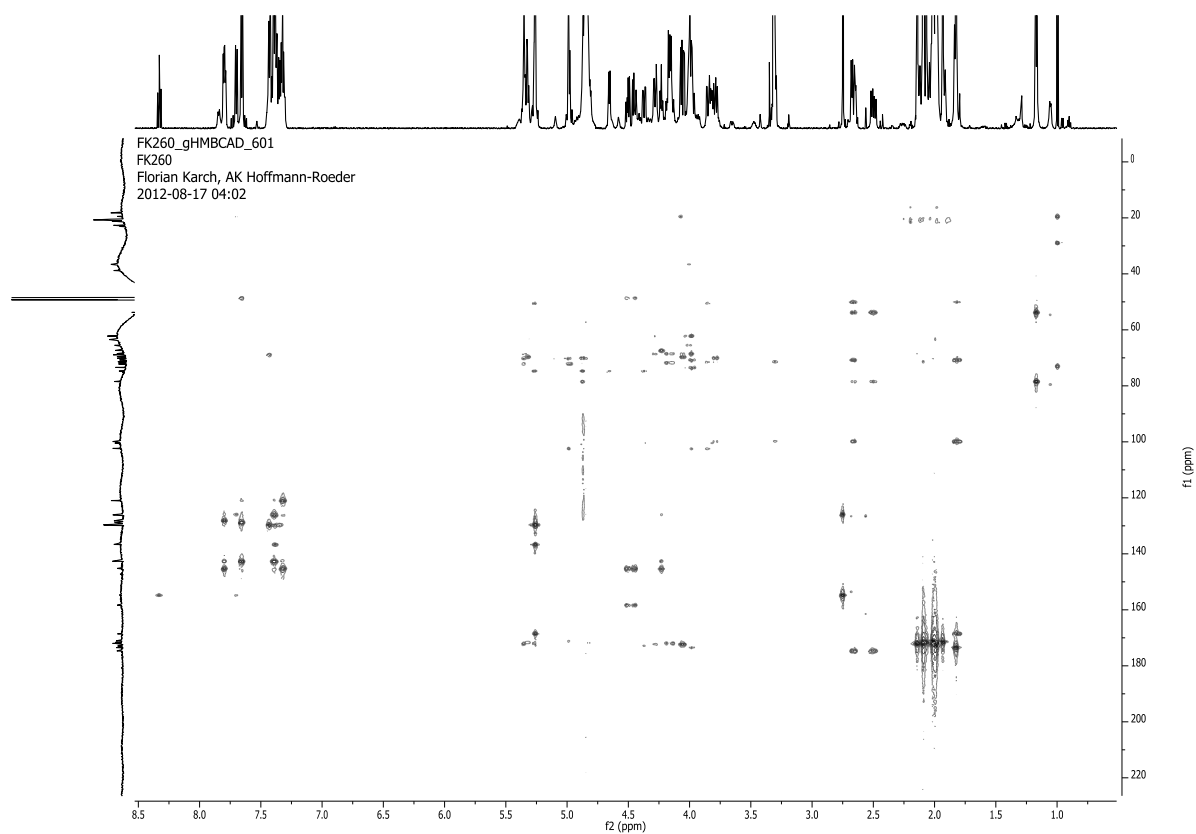


FK260\_CARBON\_601  
FK260  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-08-17 05:33

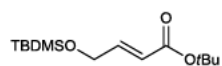




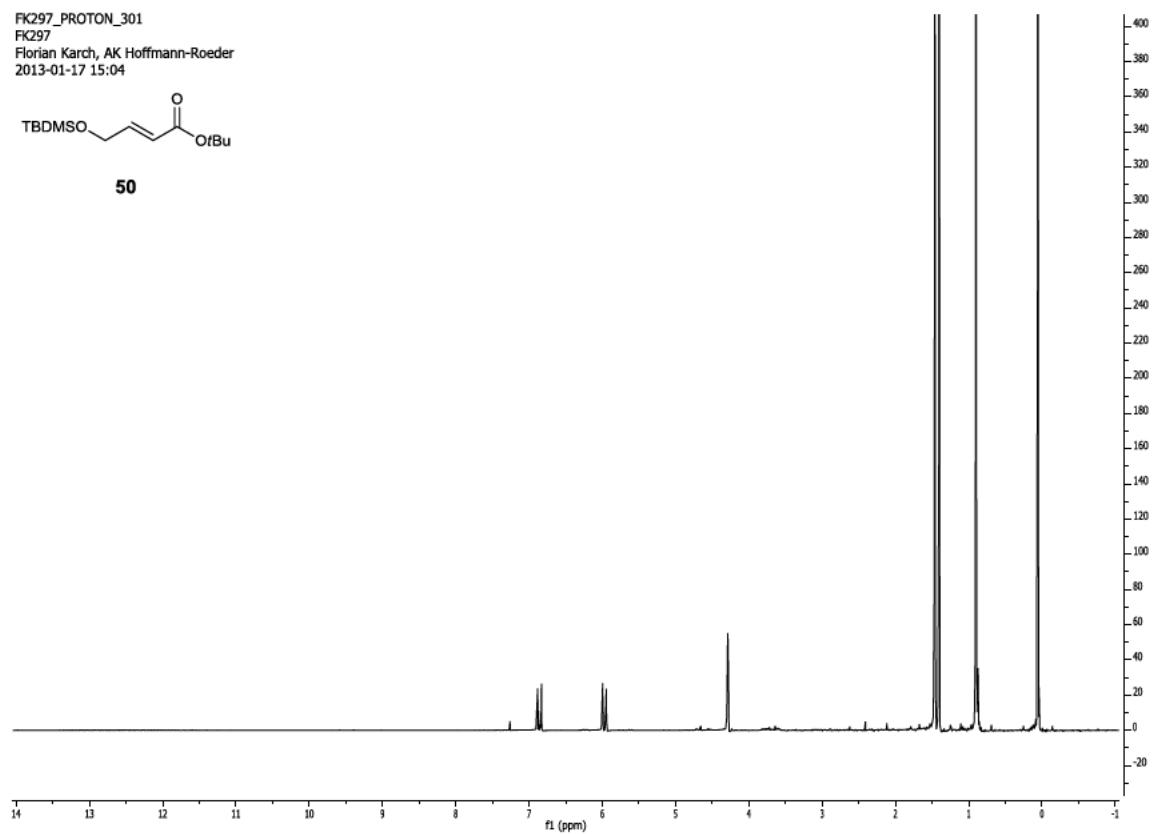




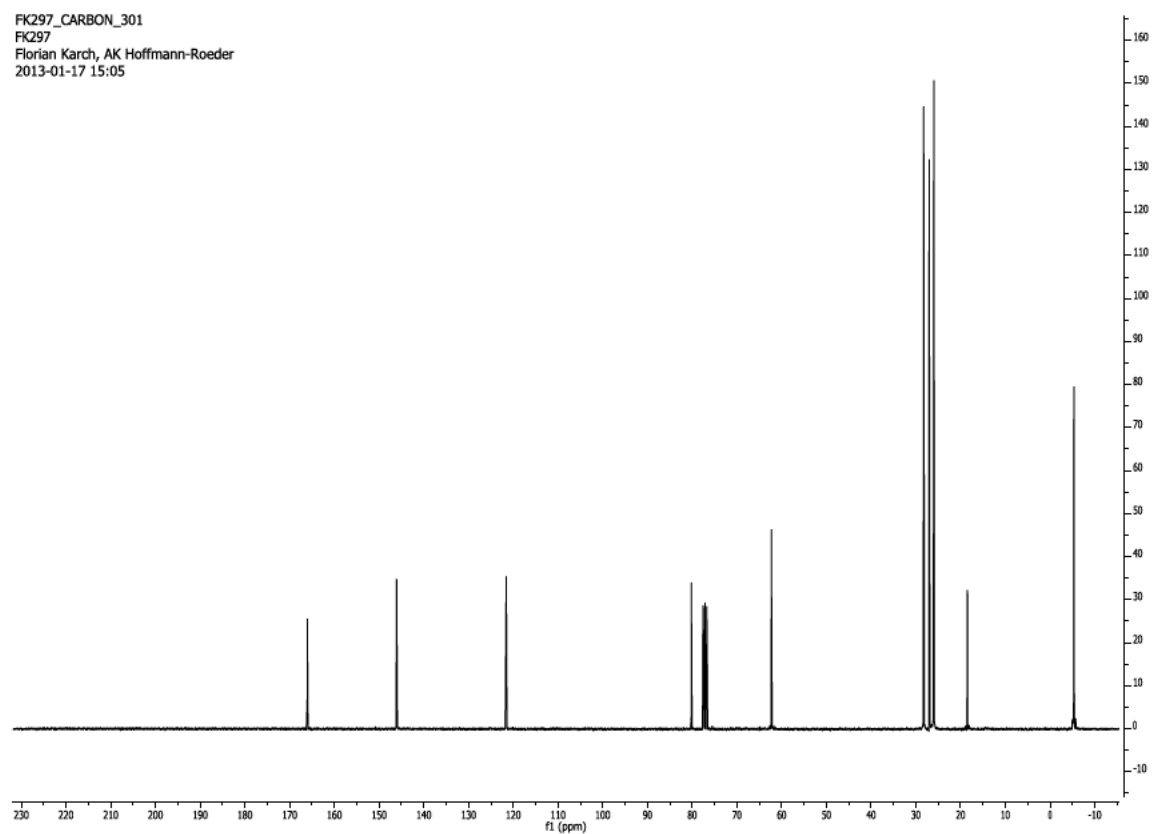
FK297\_PROTON\_301  
FK297  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2013-01-17 15:04



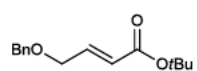
**50**



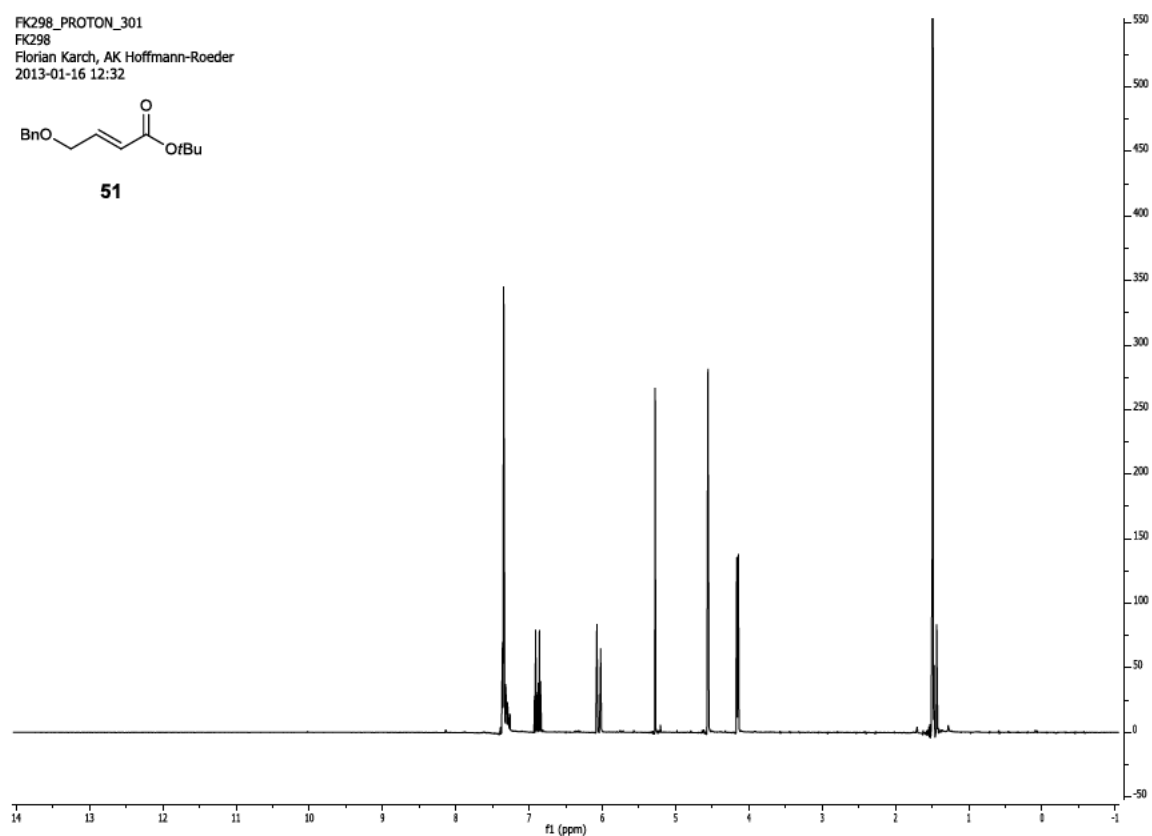
FK297\_CARBON\_301  
FK297  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2013-01-17 15:05



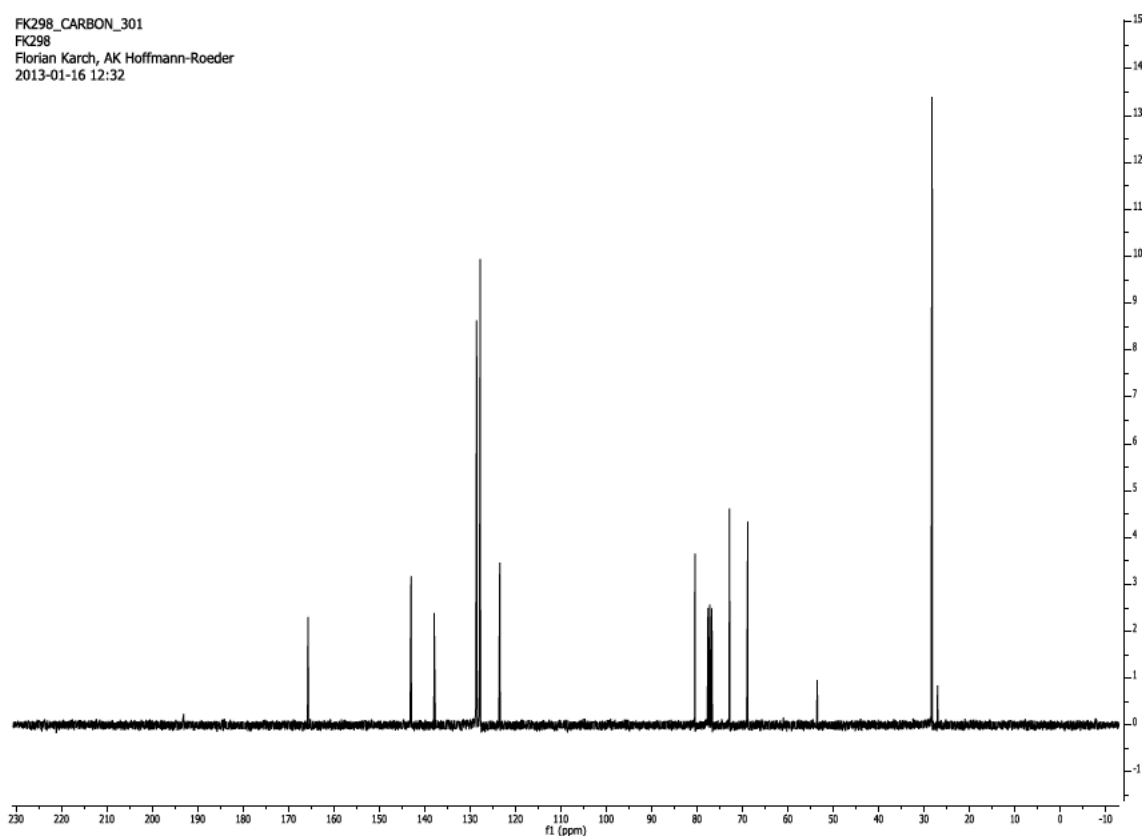
FK298\_PROTON\_301  
FK298  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2013-01-16 12:32



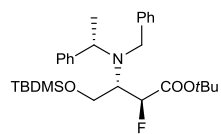
**51**



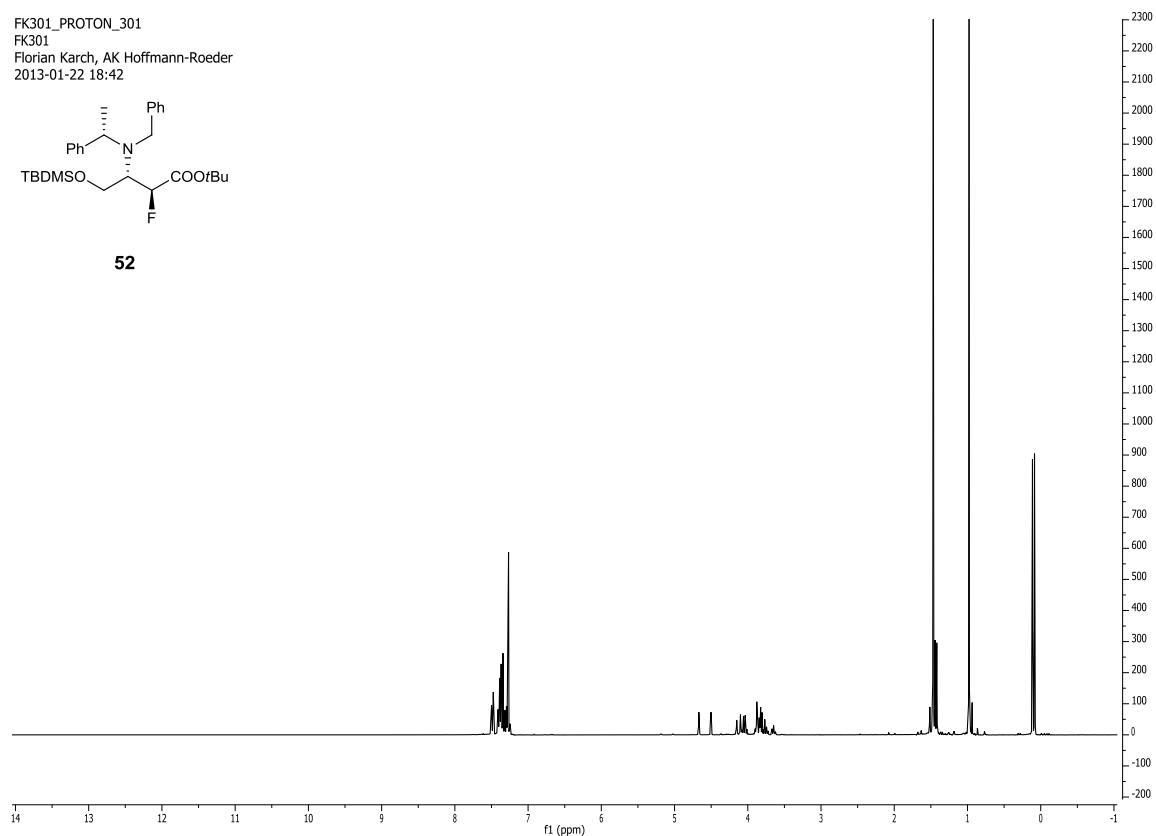
FK298\_CARBON\_301  
FK298  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2013-01-16 12:32



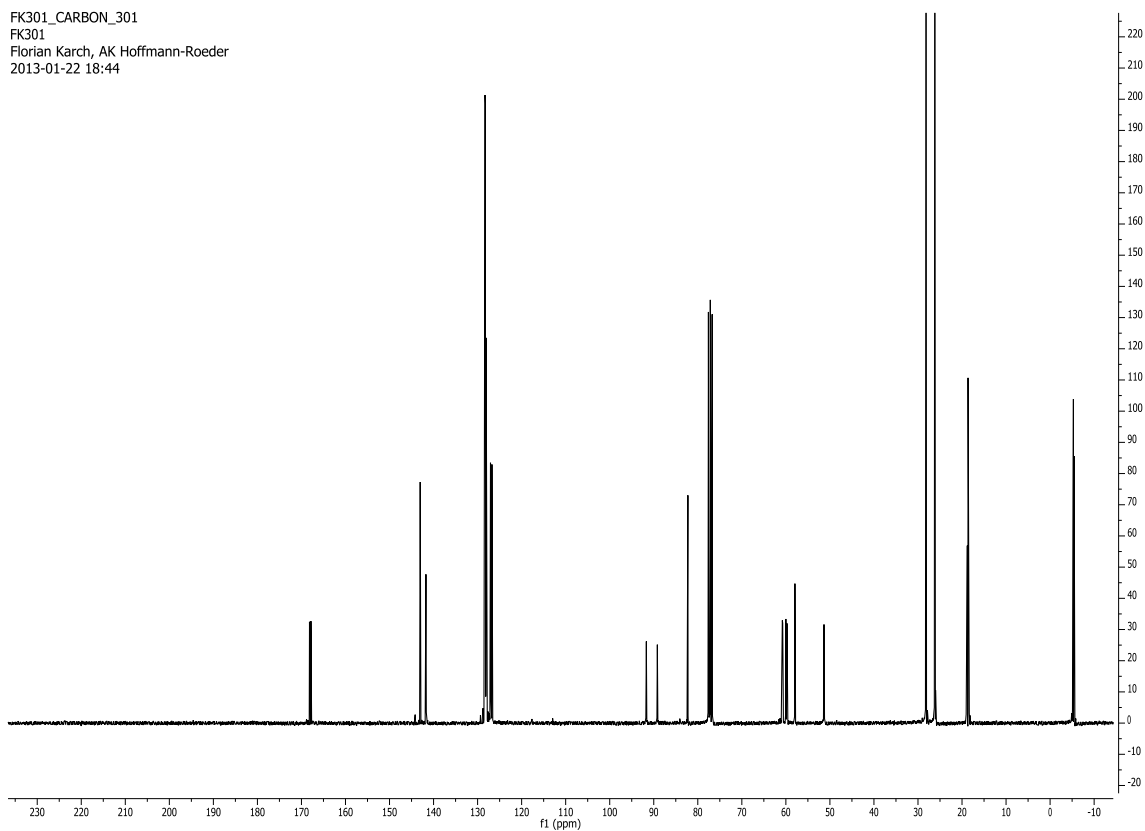
FK301\_PROTON\_301  
FK301  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2013-01-22 18:42



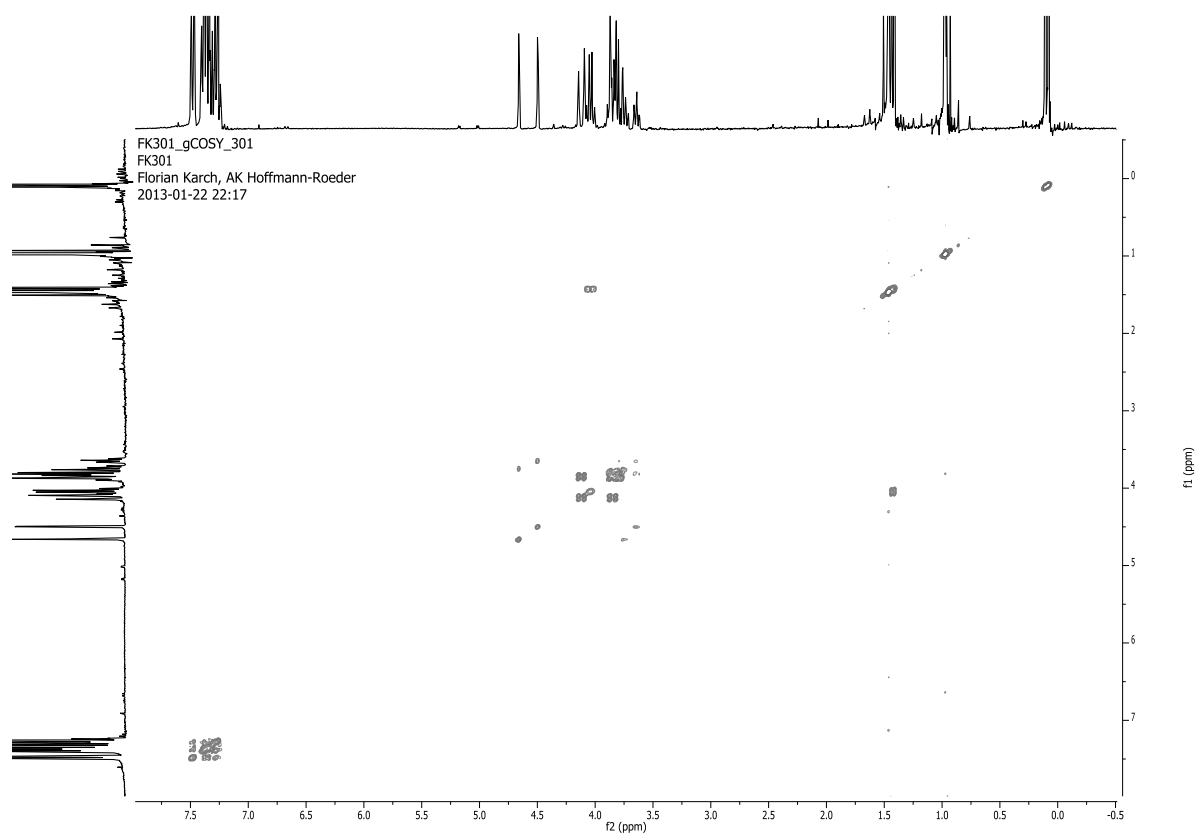
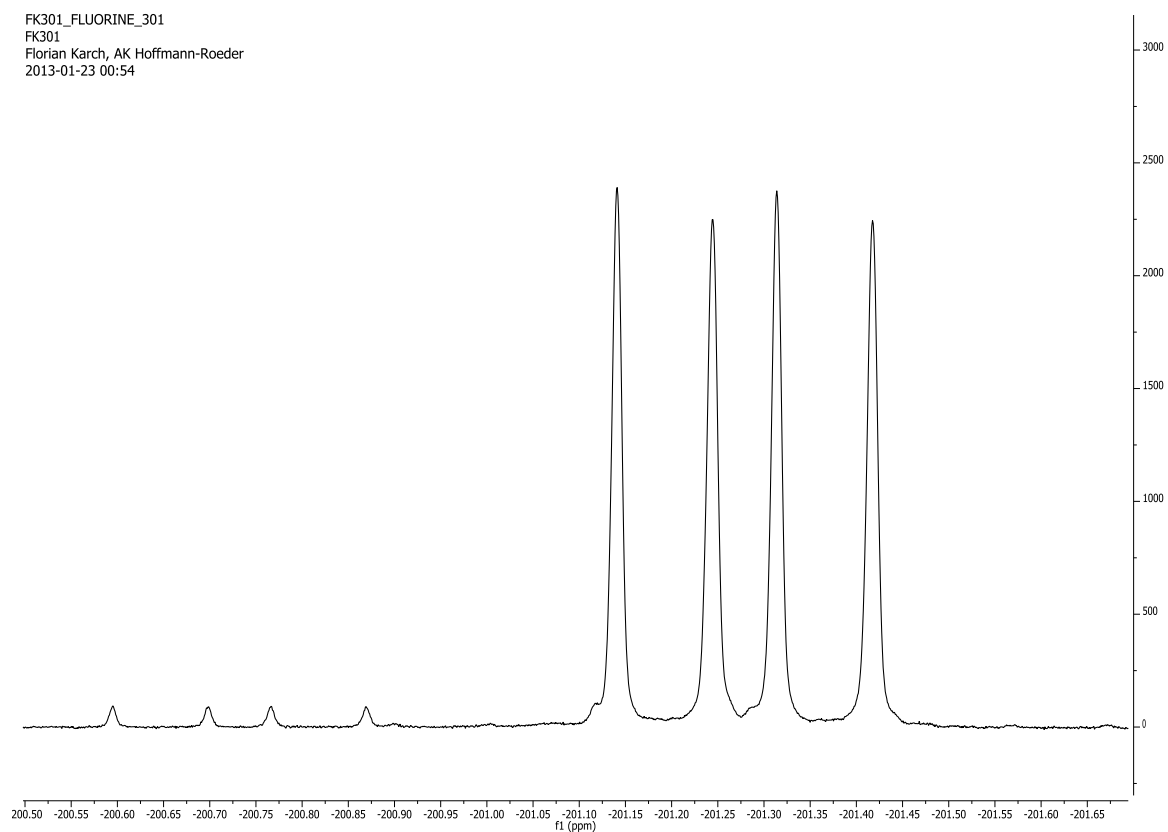
52

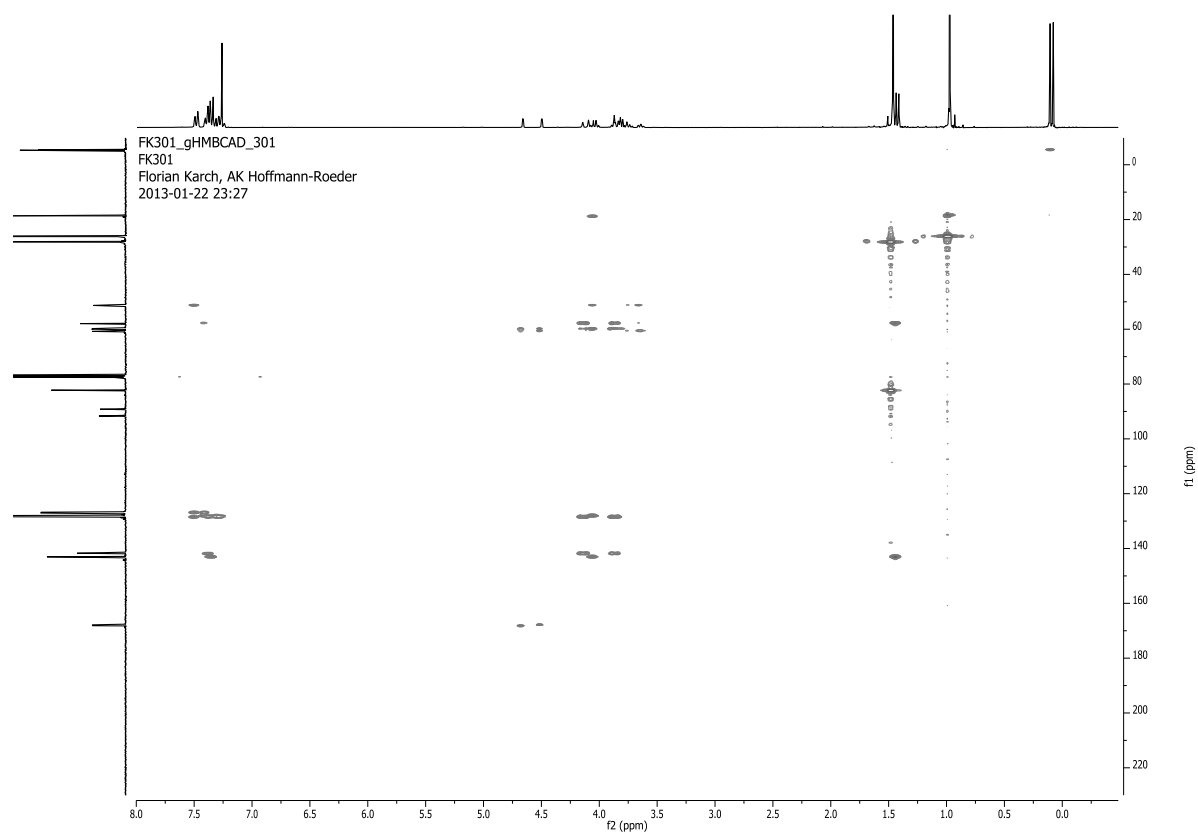


FK301\_CARBON\_301  
FK301  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2013-01-22 18:44

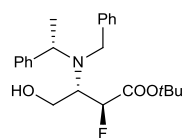


FK301\_FLUORINE\_301  
FK301  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2013-01-23 00:54

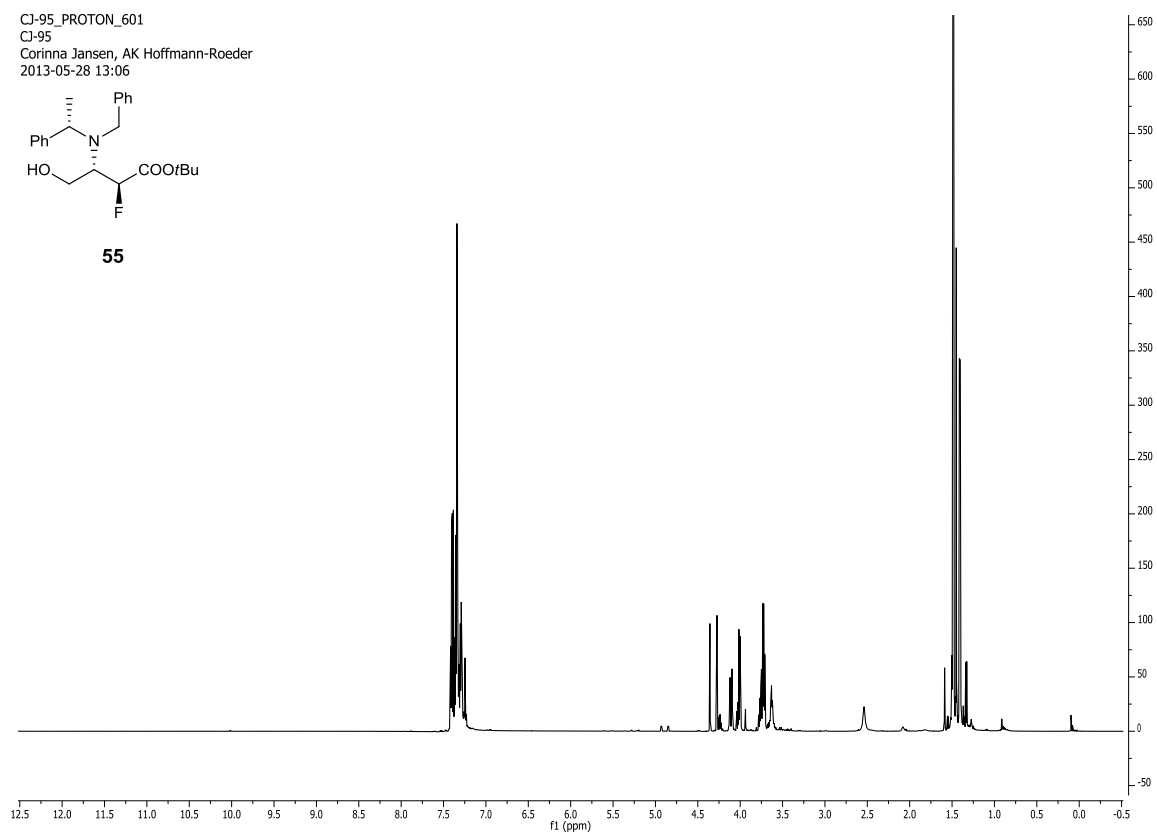




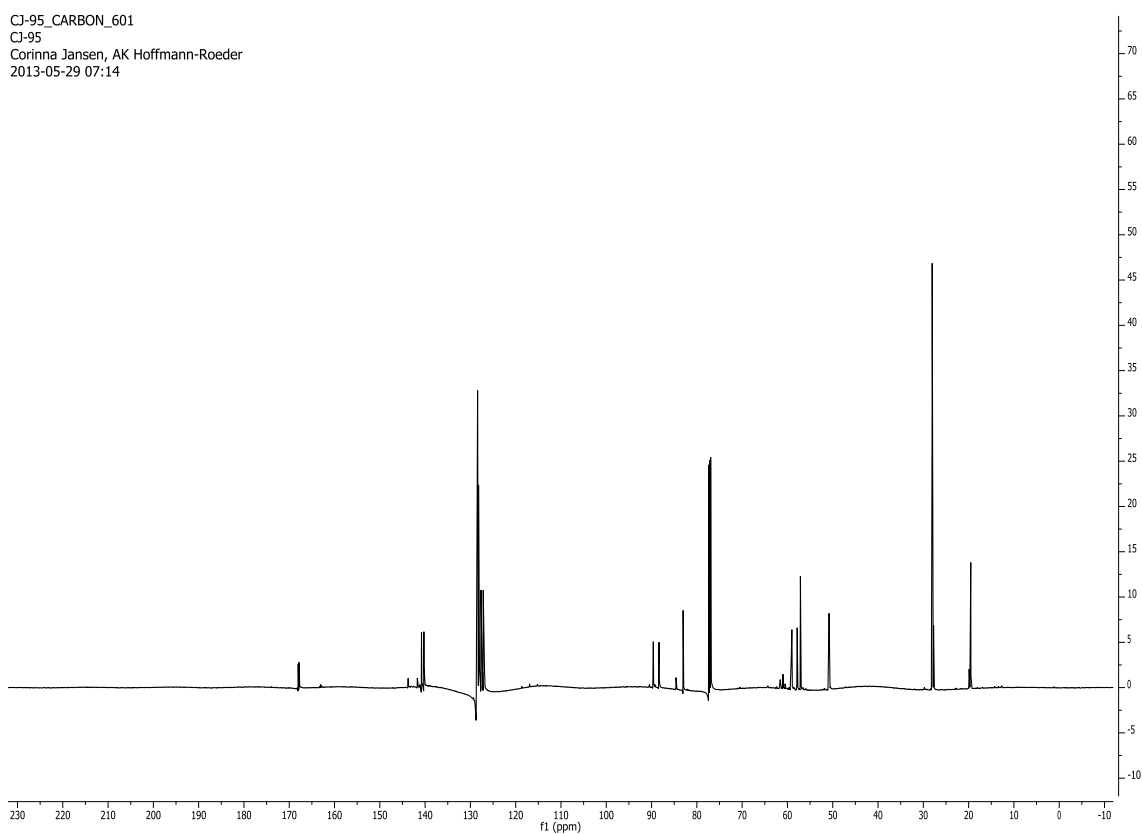
CJ-95\_PROTON\_601  
CJ-95  
Corinna Jansen, AK Hoffmann-Roeder  
2013-05-28 13:06



**55**

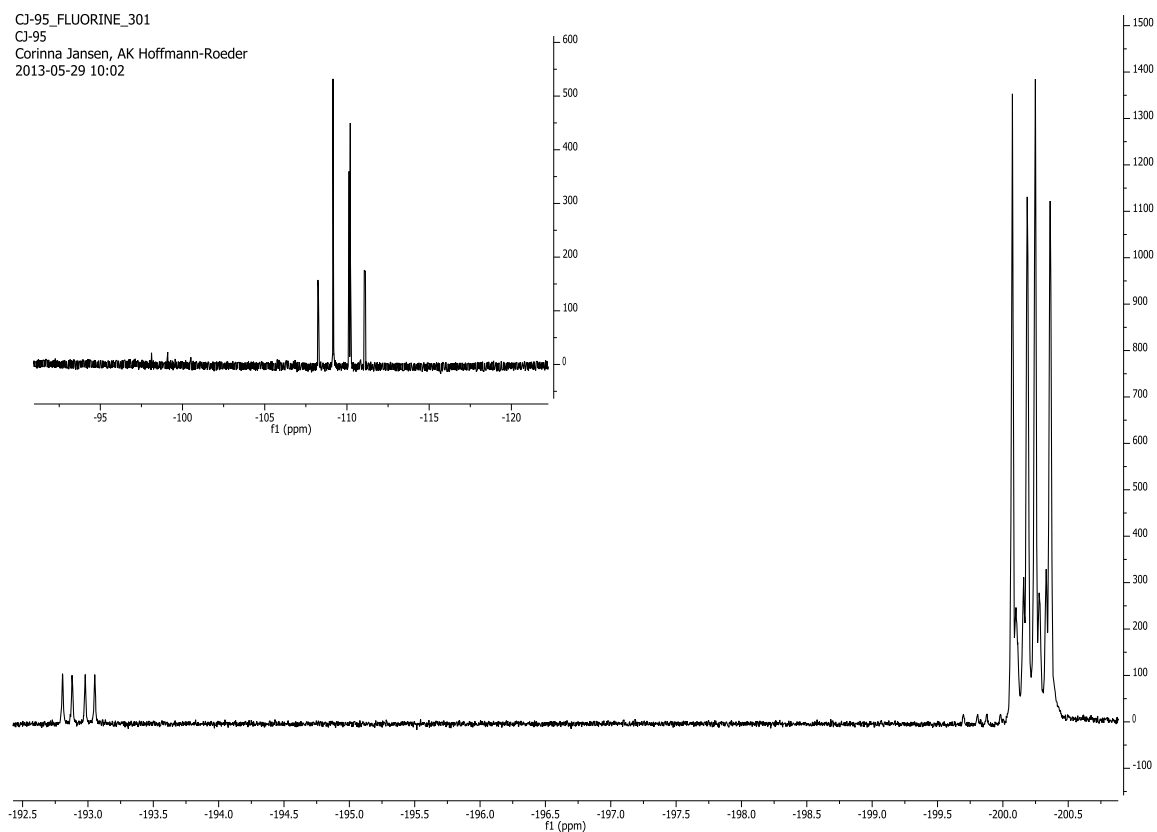


CJ-95\_CARBON\_601  
CJ-95  
Corinna Jansen, AK Hoffmann-Roeder  
2013-05-29 07:14

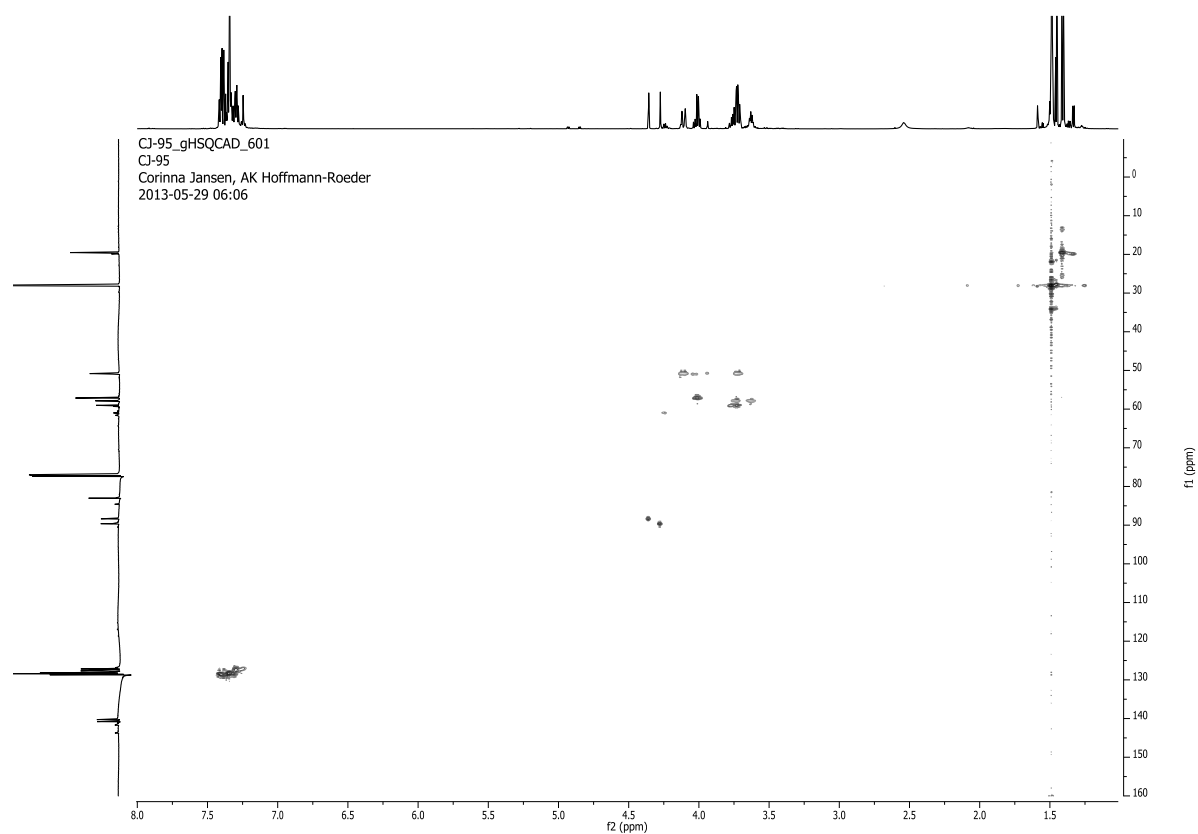


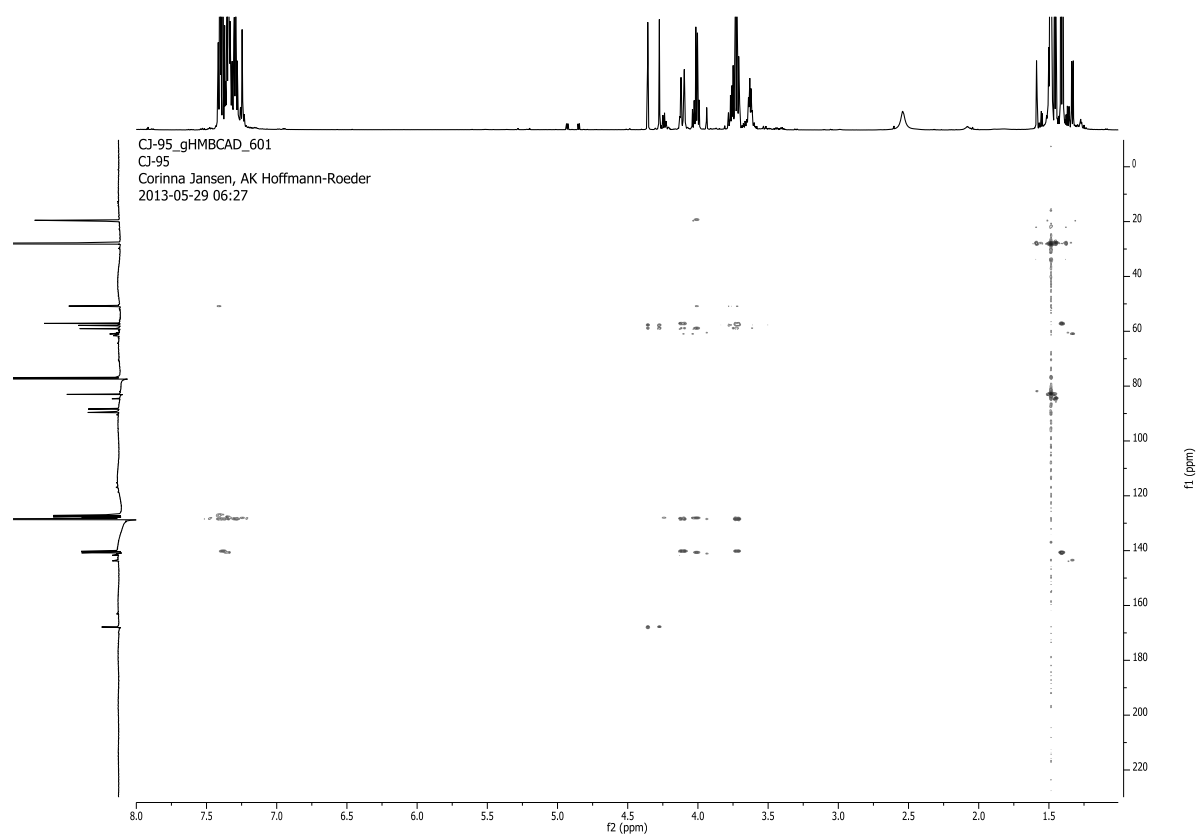


CJ-95\_FLUORINE\_301  
CJ-95  
Corinna Jansen, AK Hoffmann-Roeder  
2013-05-29 10:02

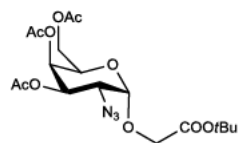


CJ-95\_gHSQCAD\_601  
CJ-95  
Corinna Jansen, AK Hoffmann-Roeder  
2013-05-29 06:06

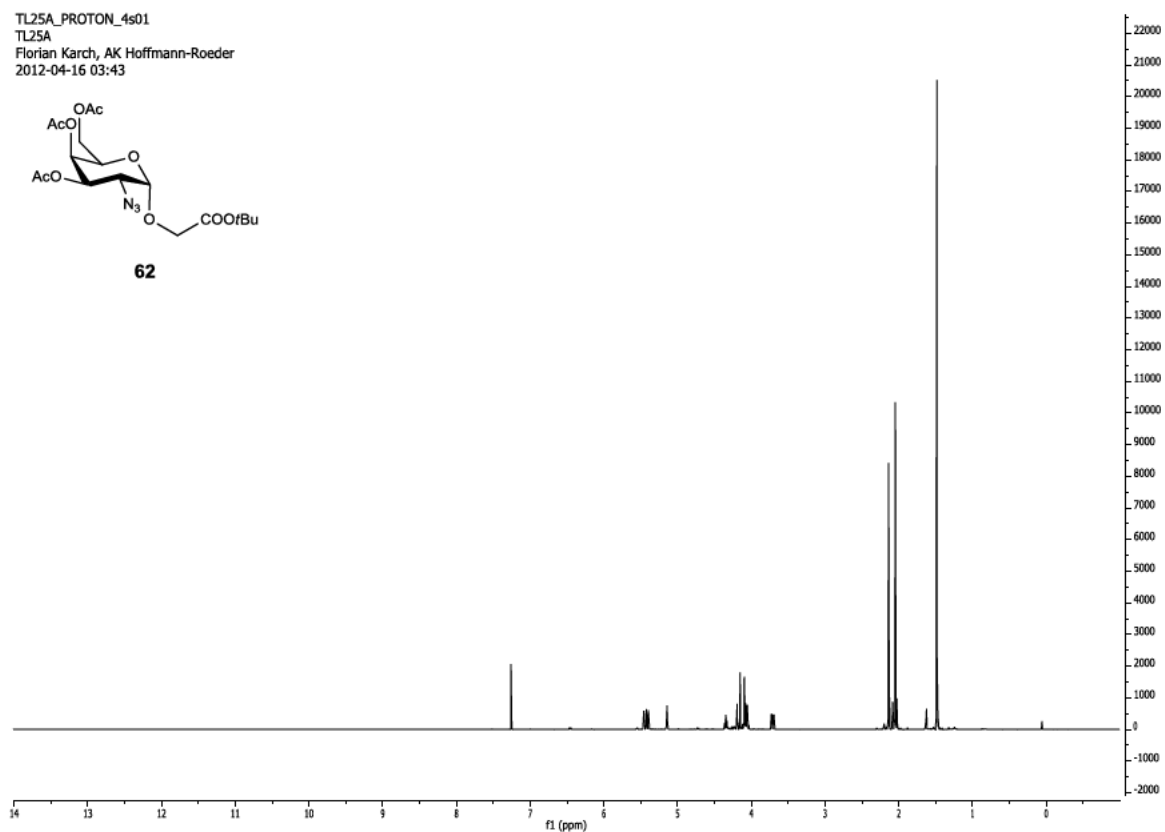




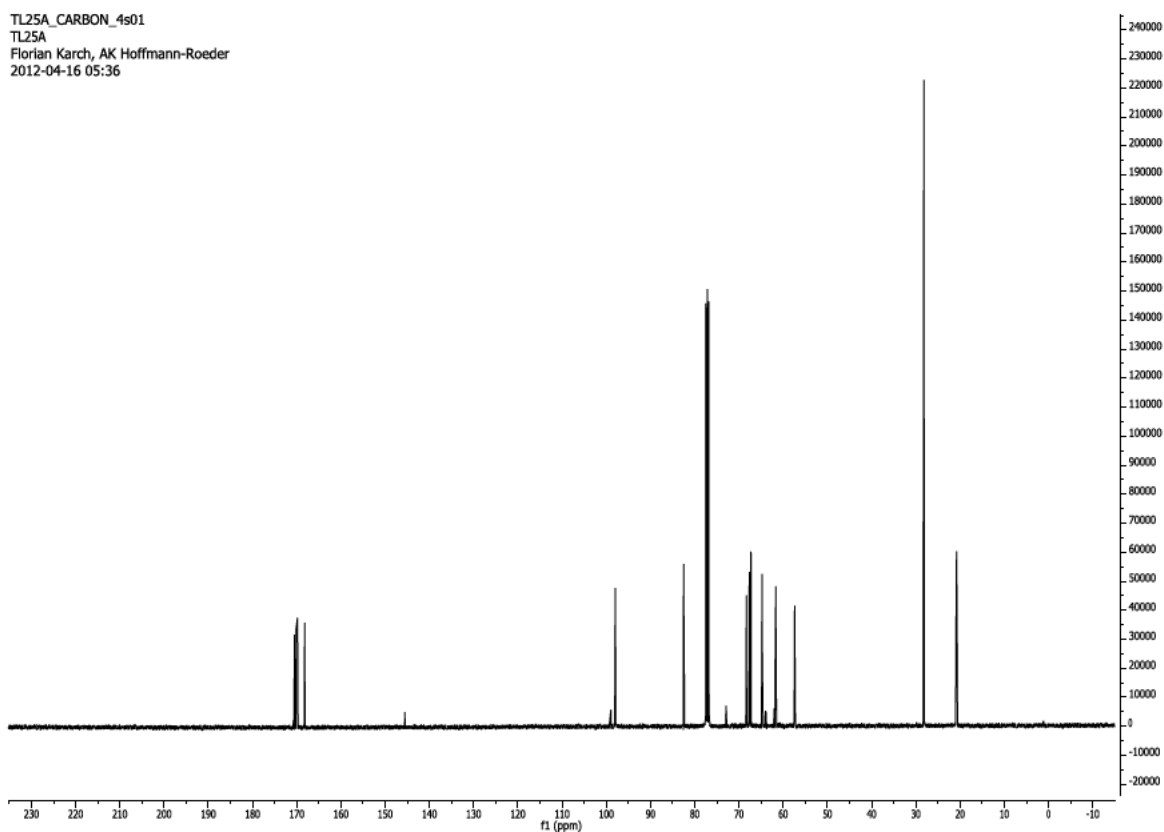
TL25A\_PROTON\_4s01  
TL25A  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-04-16 03:43

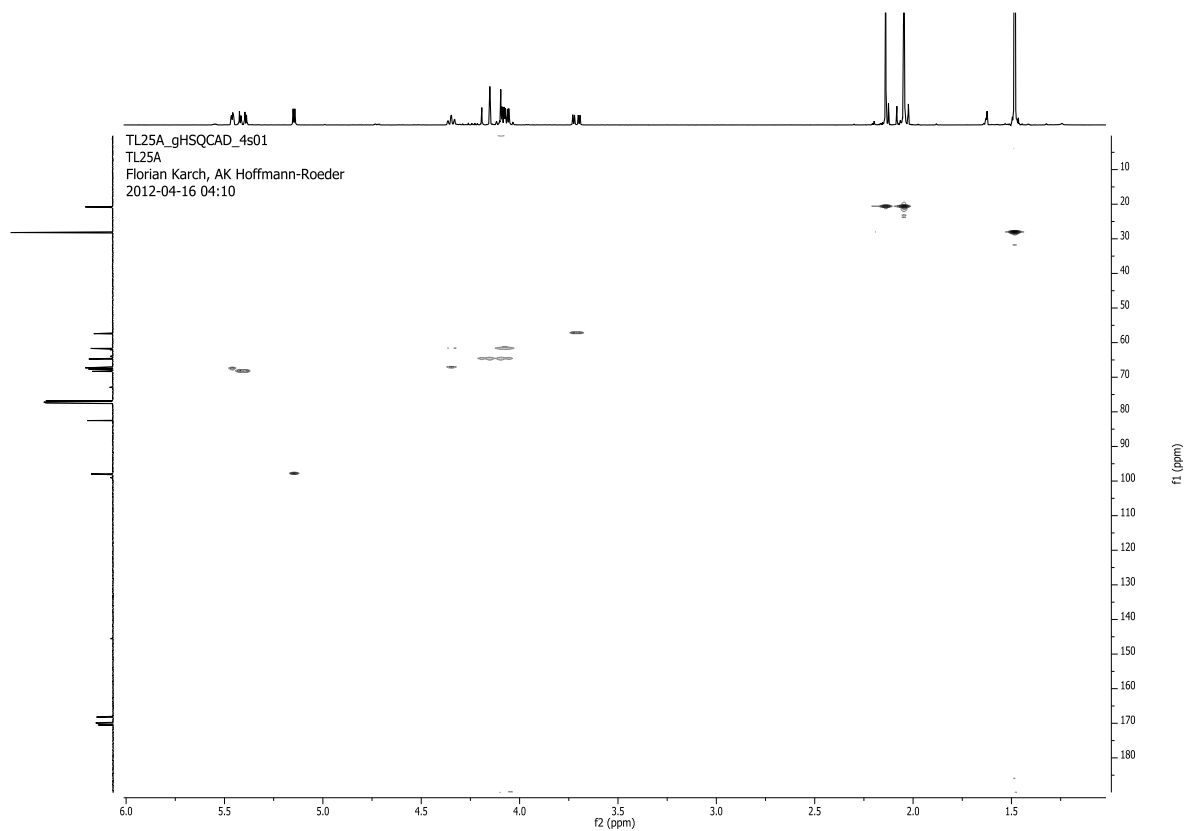
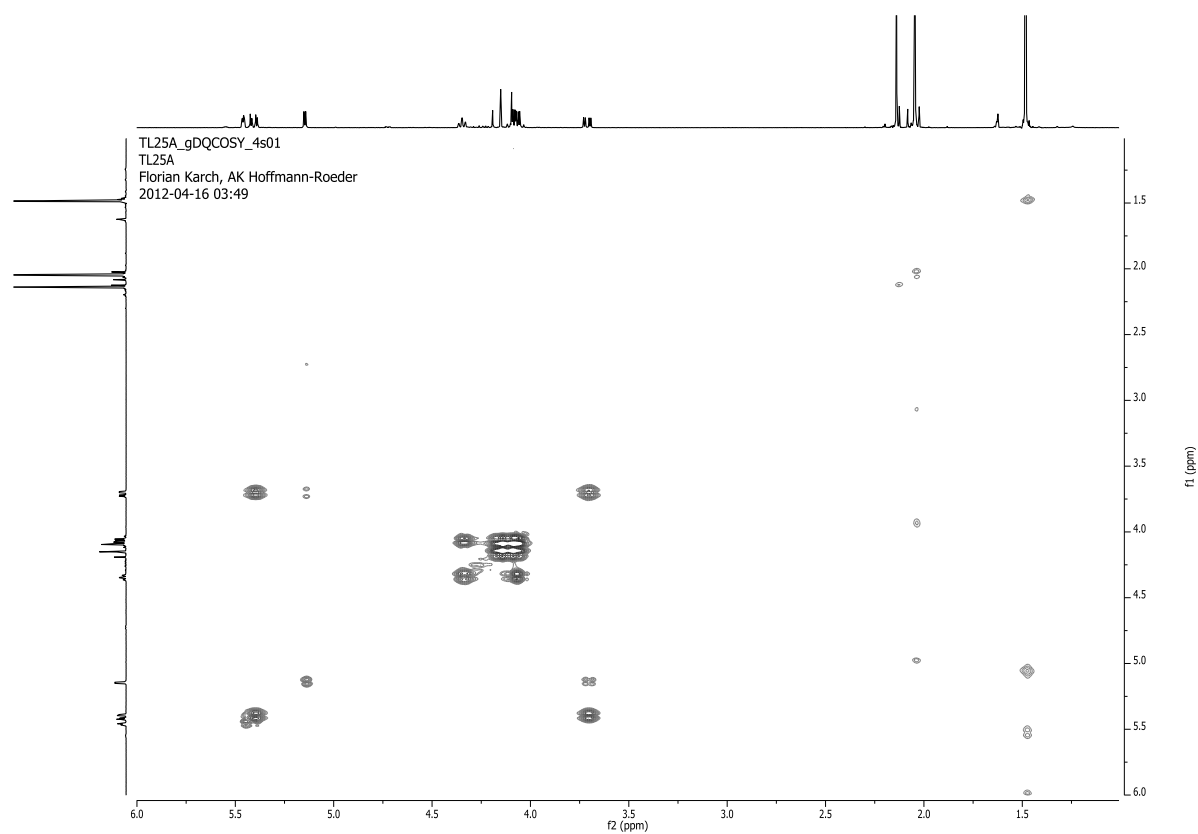


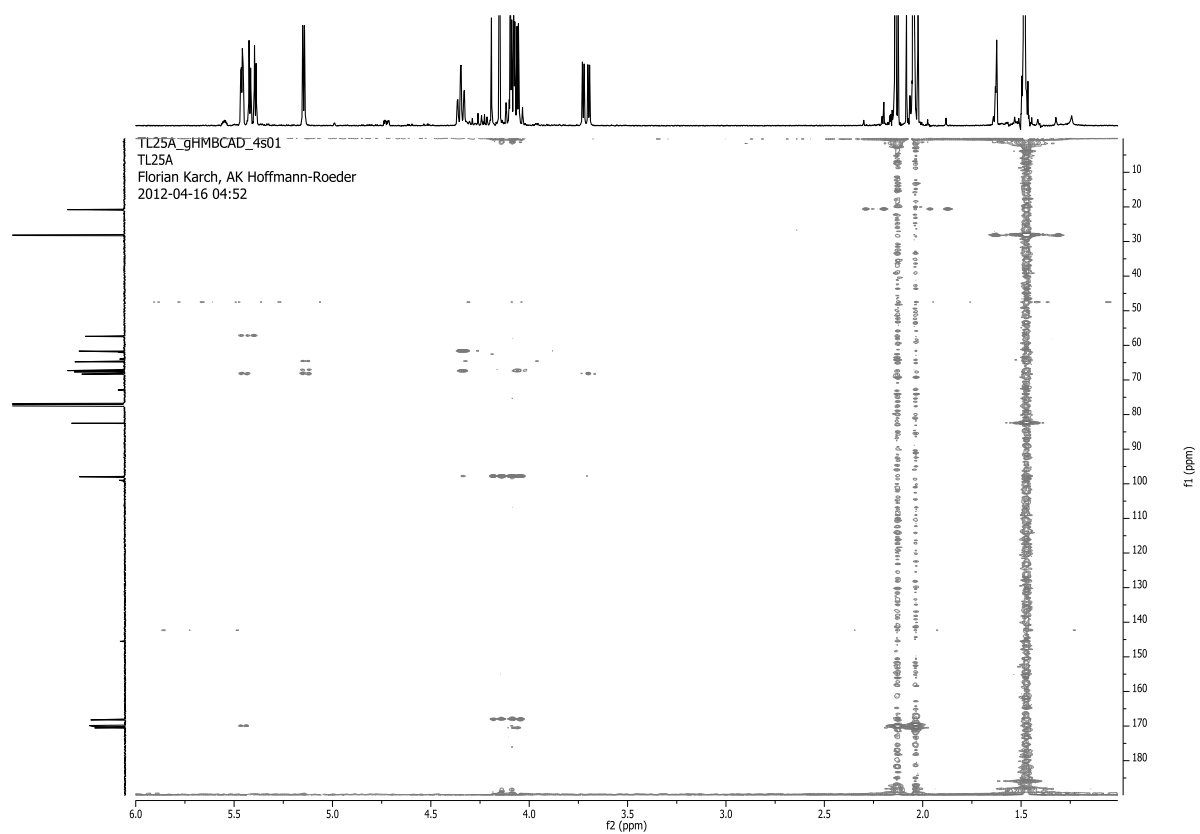
62



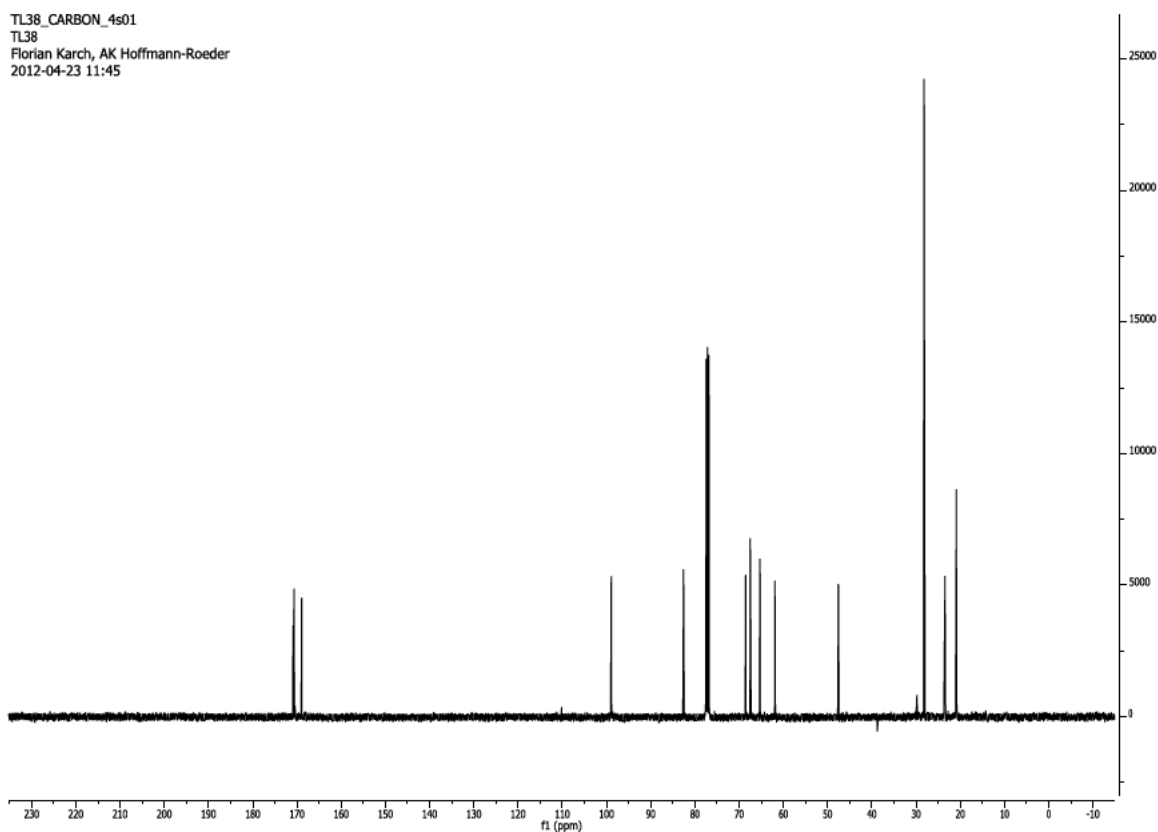
TL25A\_CARBON\_4s01  
TL25A  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-04-16 05:36

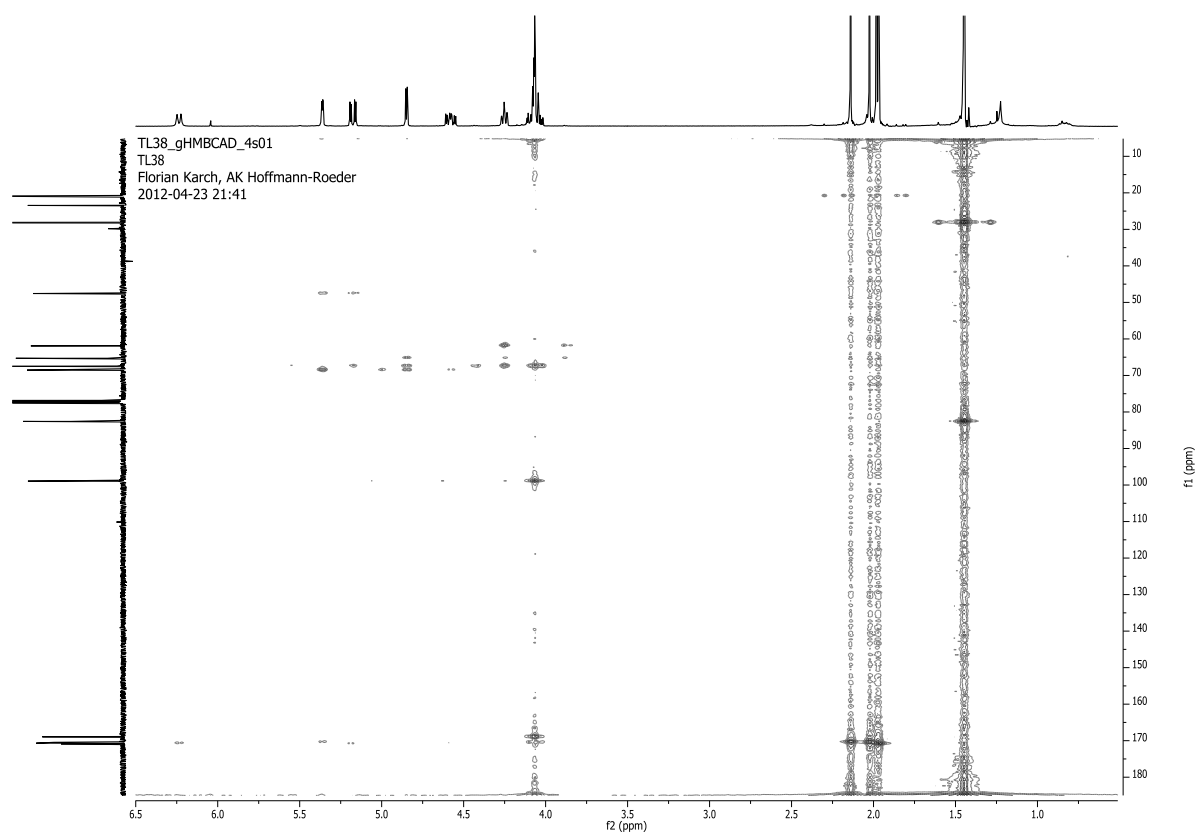
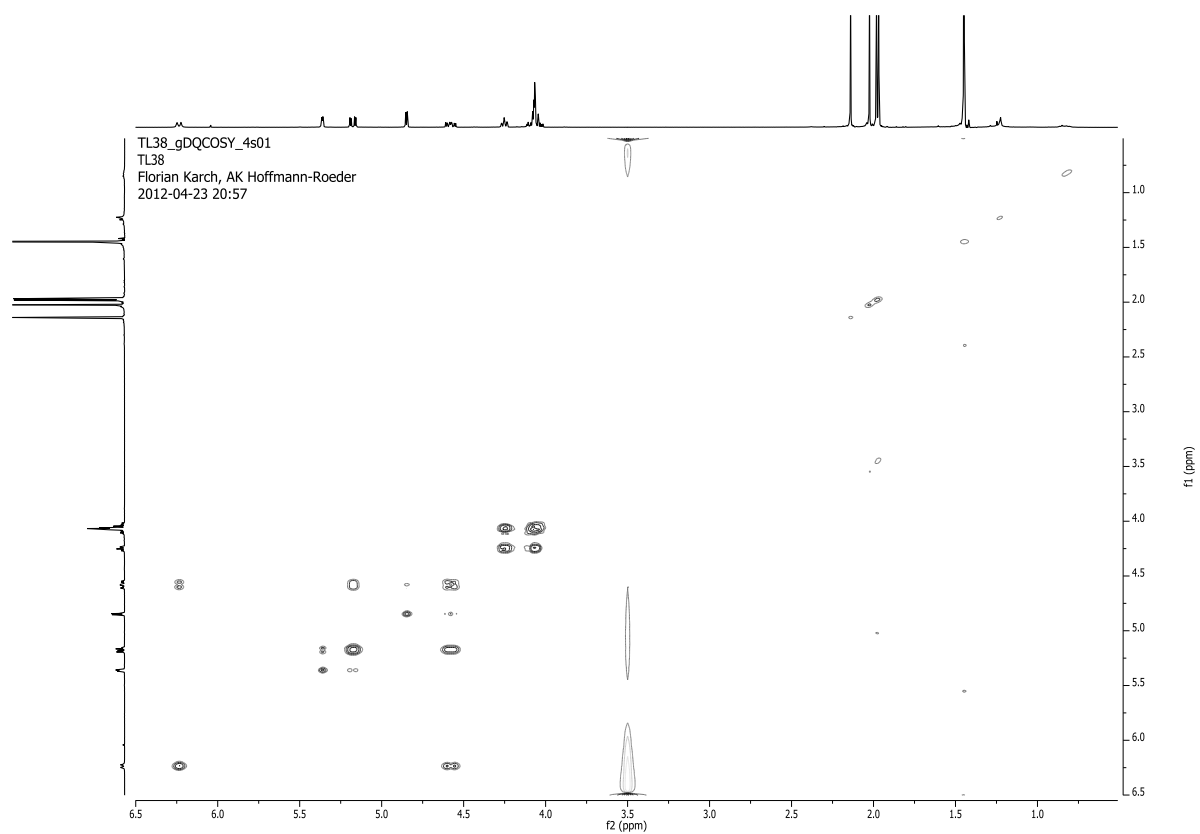






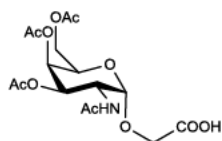
64



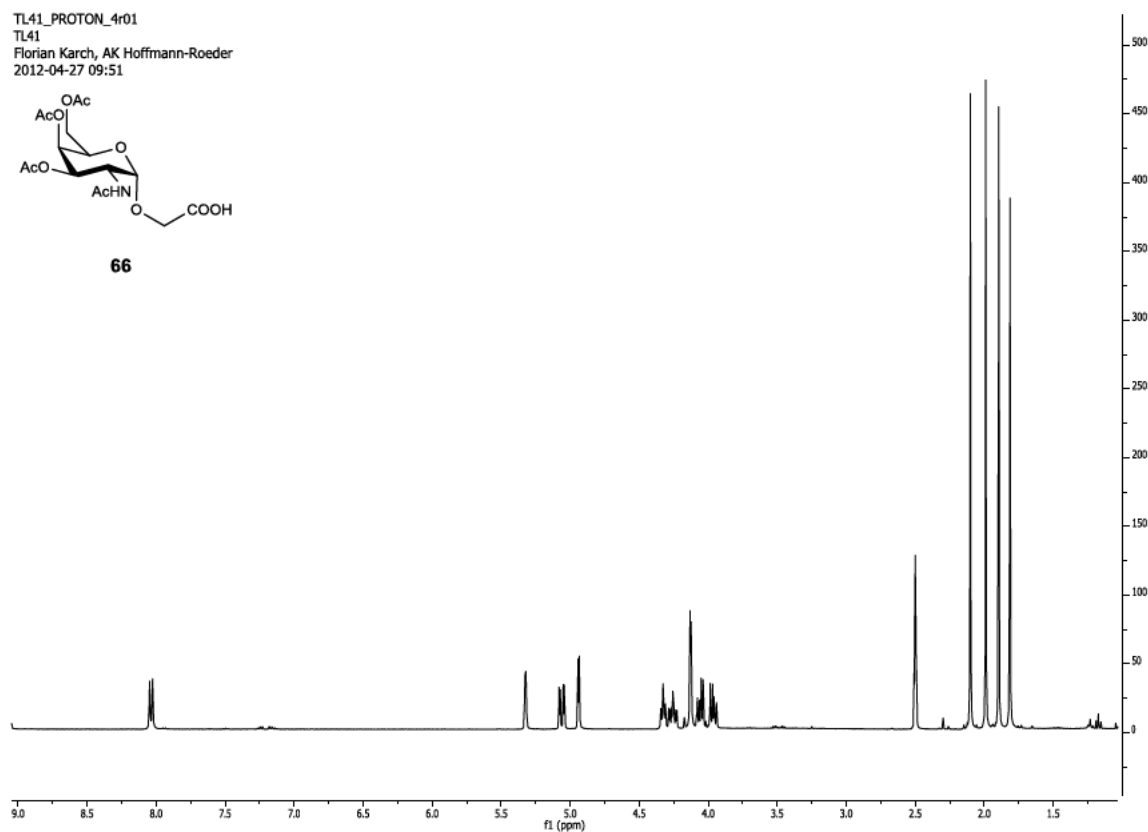




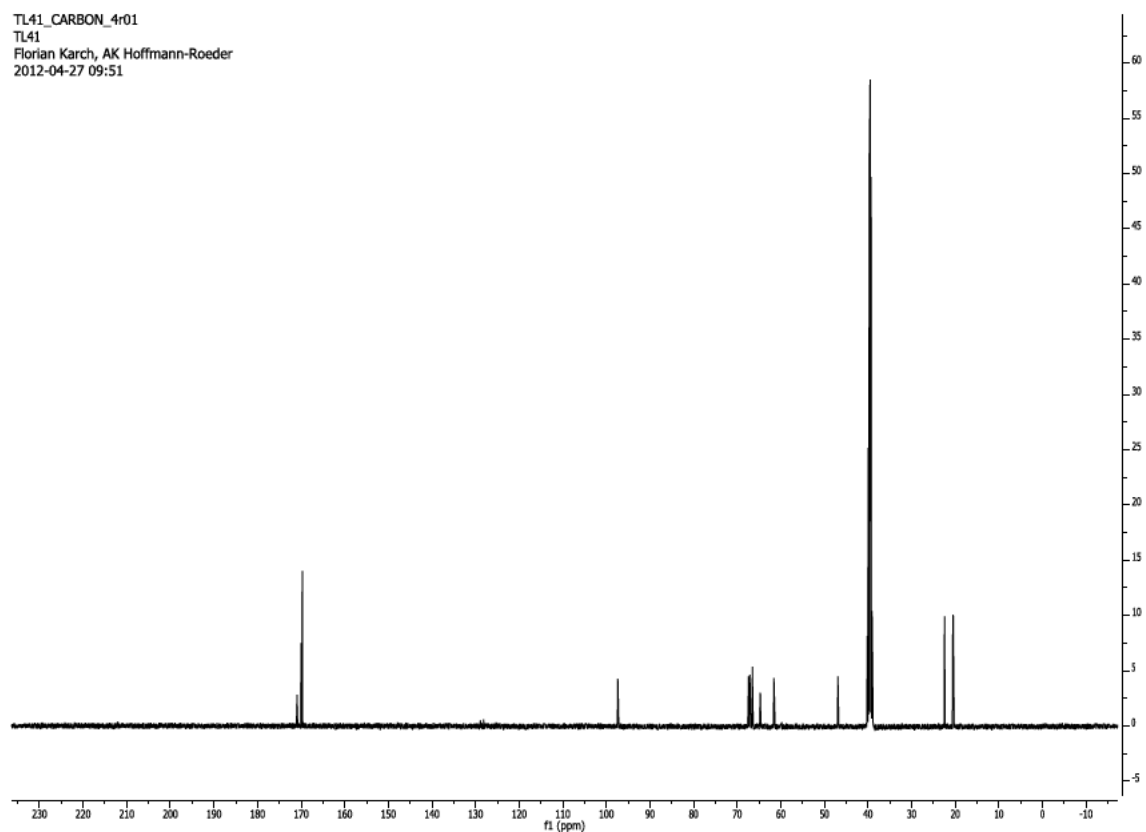
TL41\_PROTON\_4r01  
TL41  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-04-27 09:51

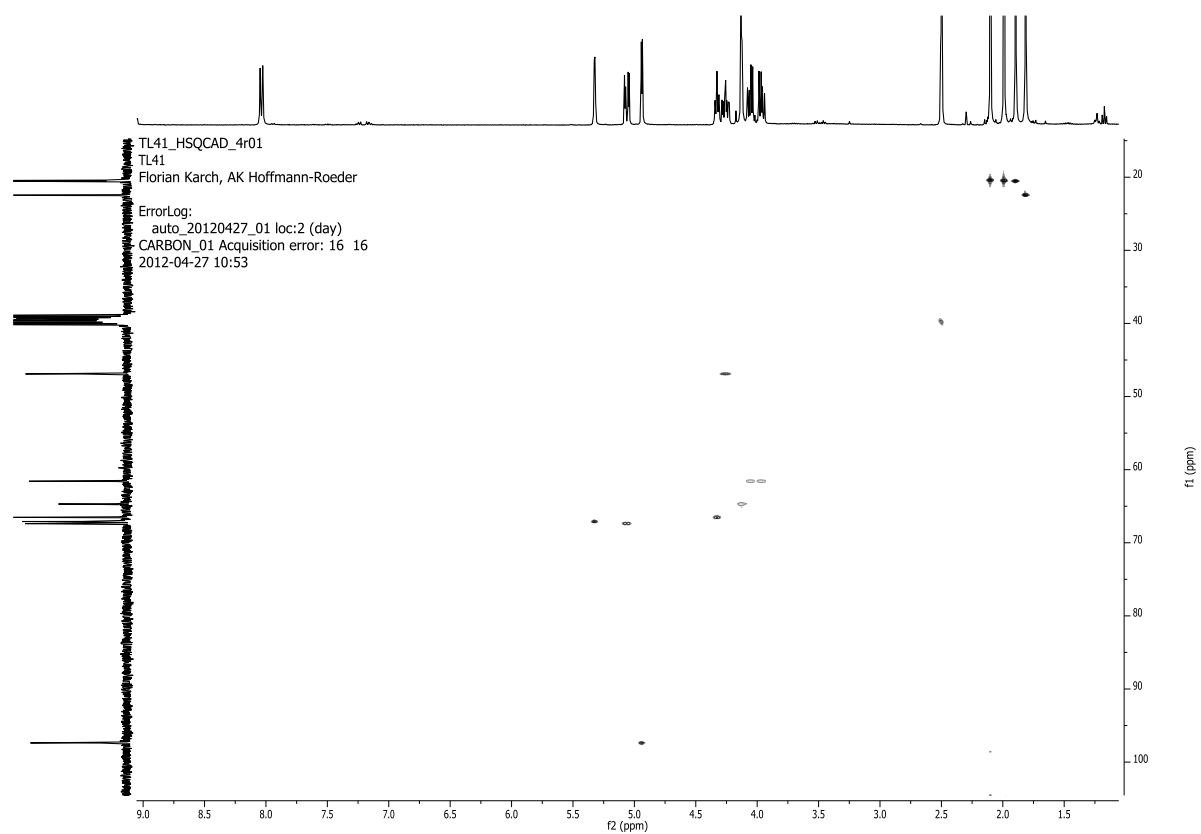
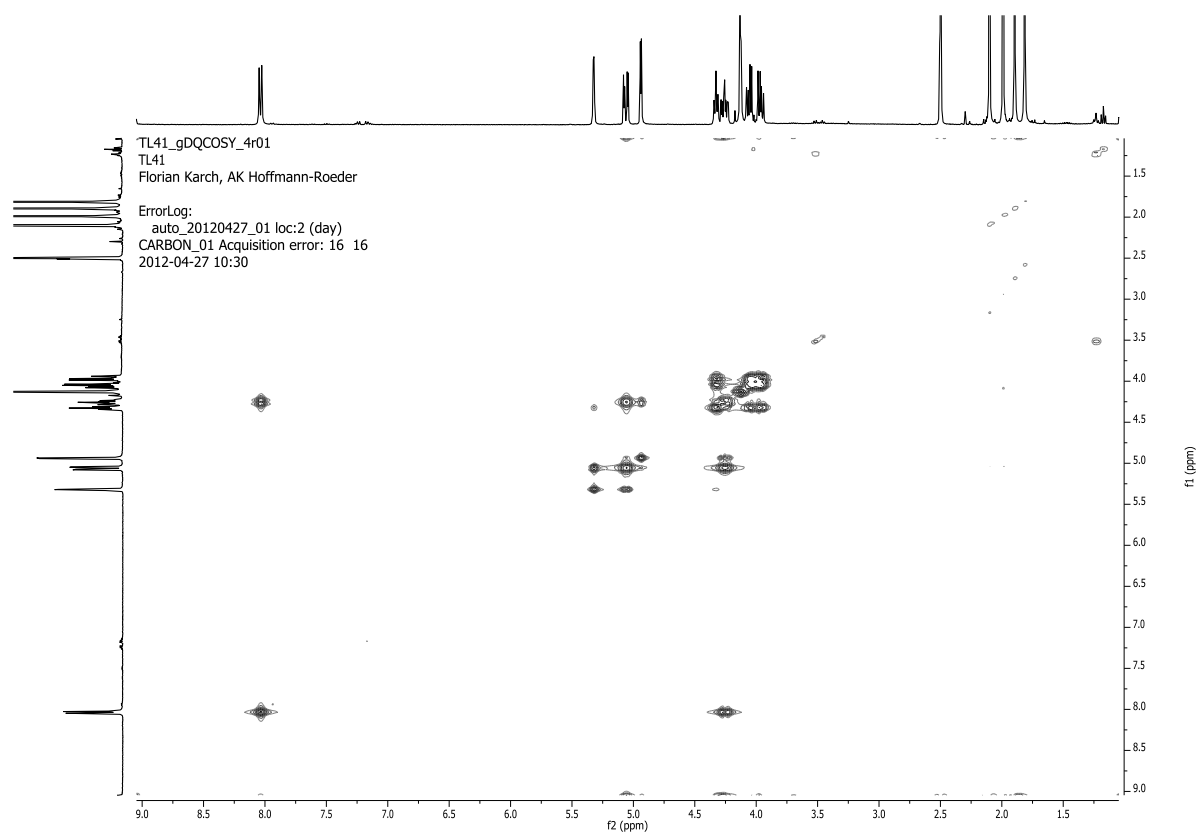


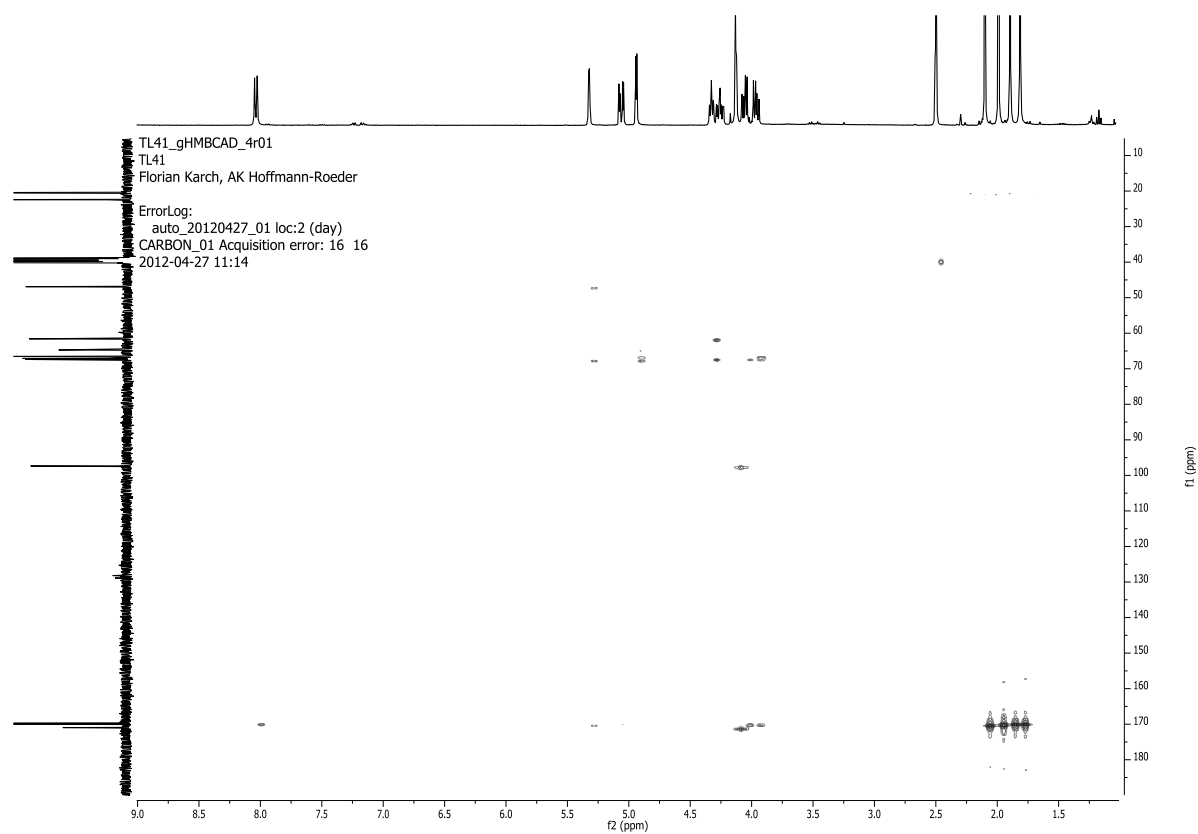
66



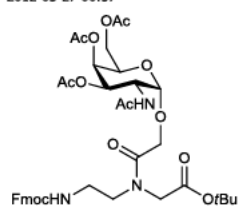
TL41\_CARBON\_4r01  
TL41  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-04-27 09:51



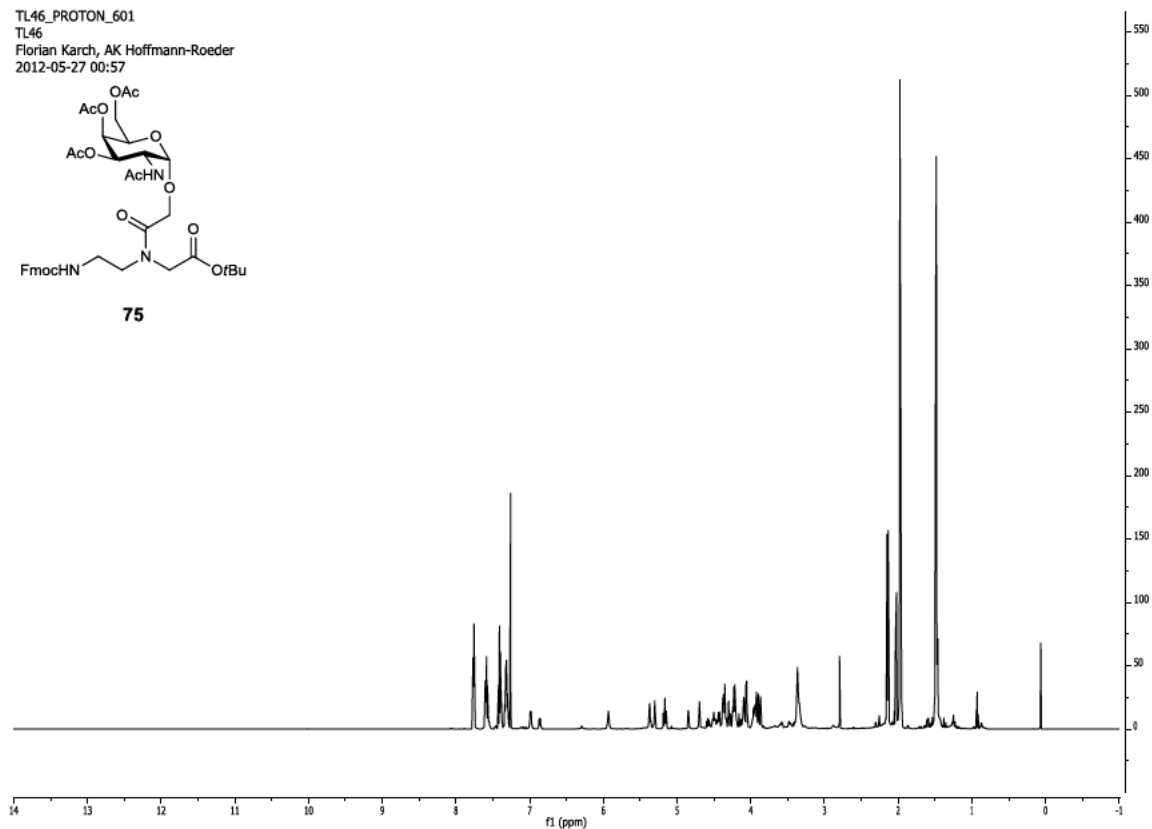




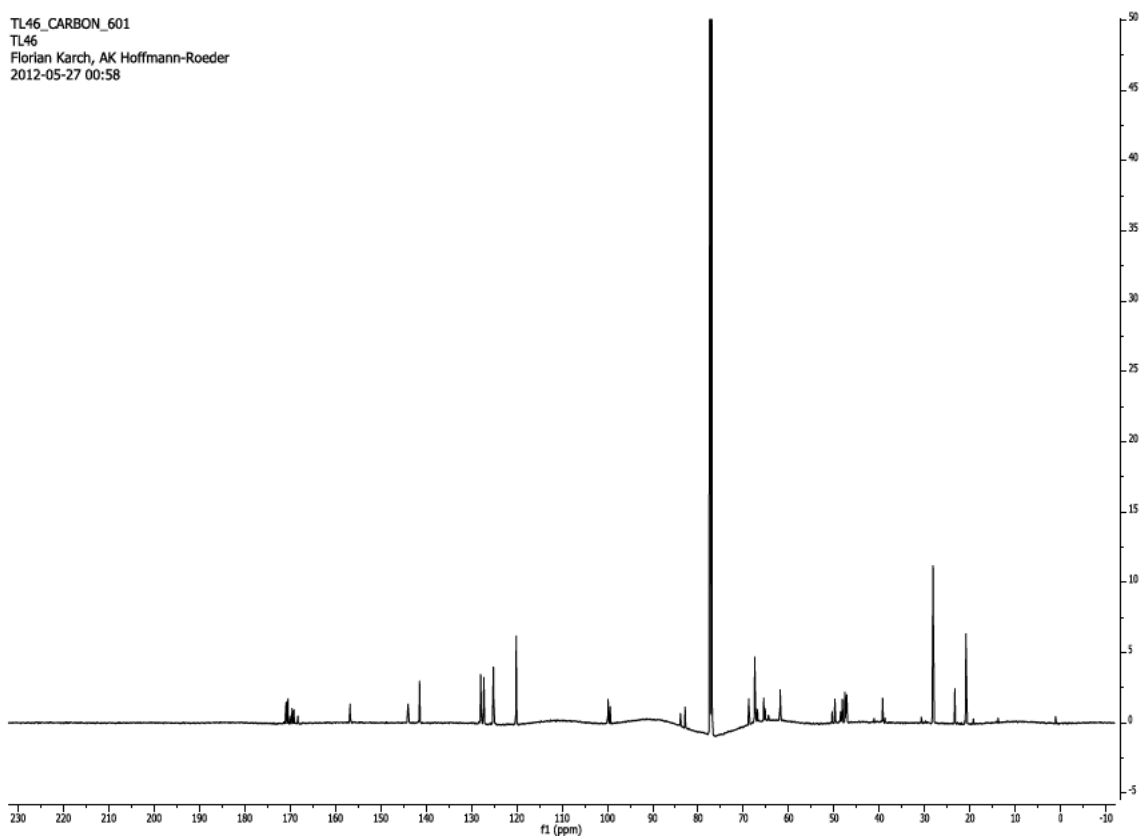
TL46\_PROTON\_601  
TL46  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-05-27 00:57

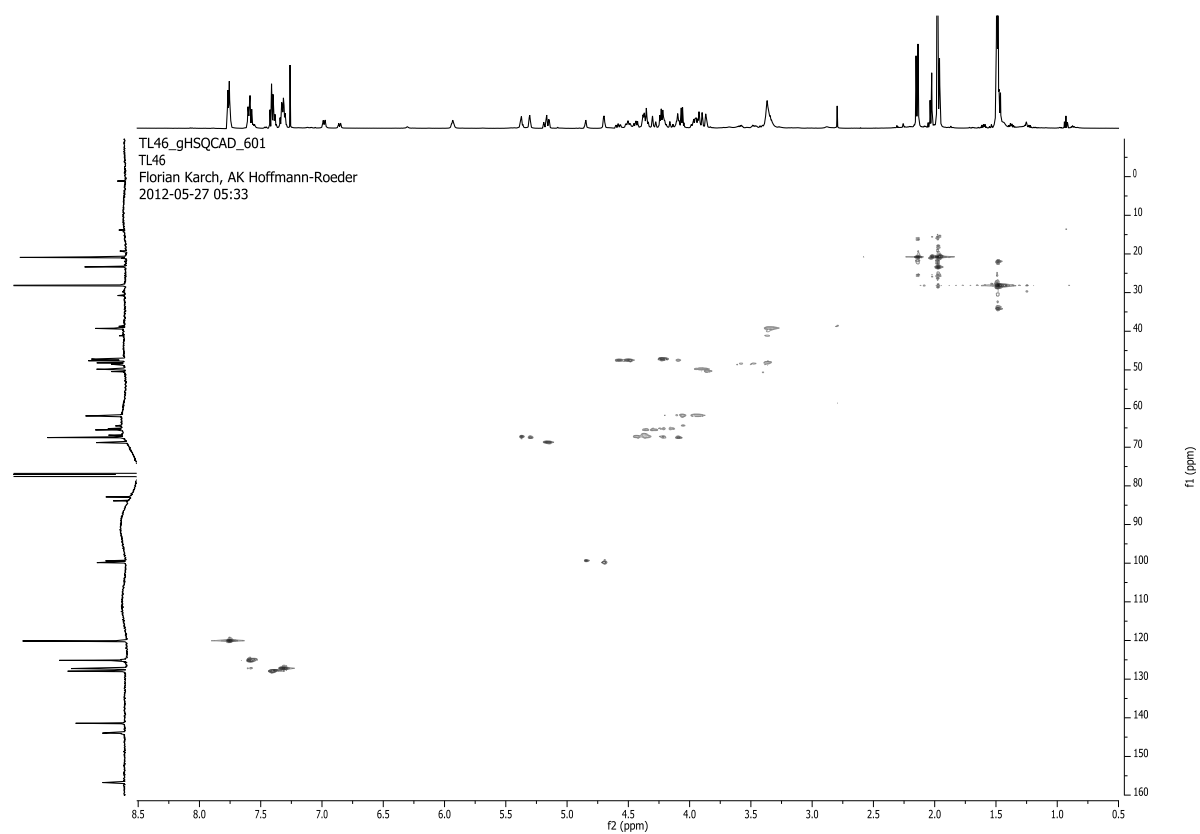
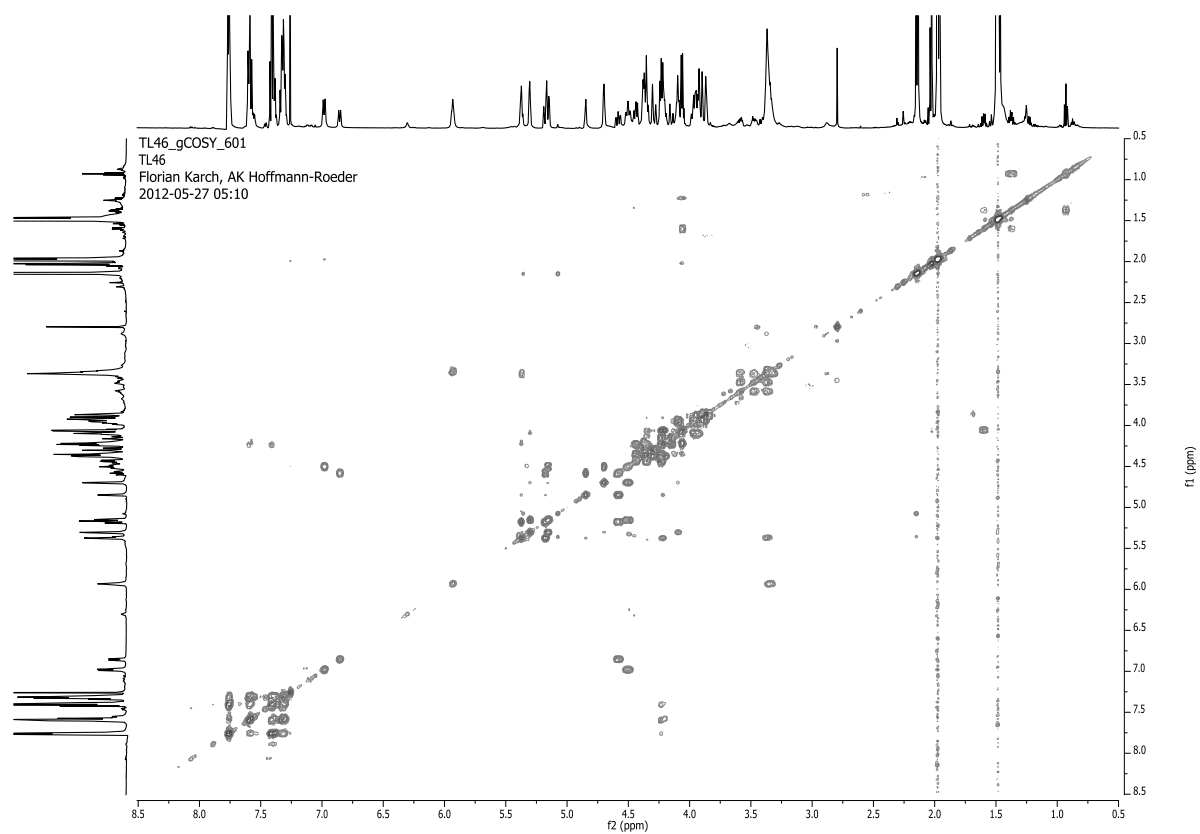


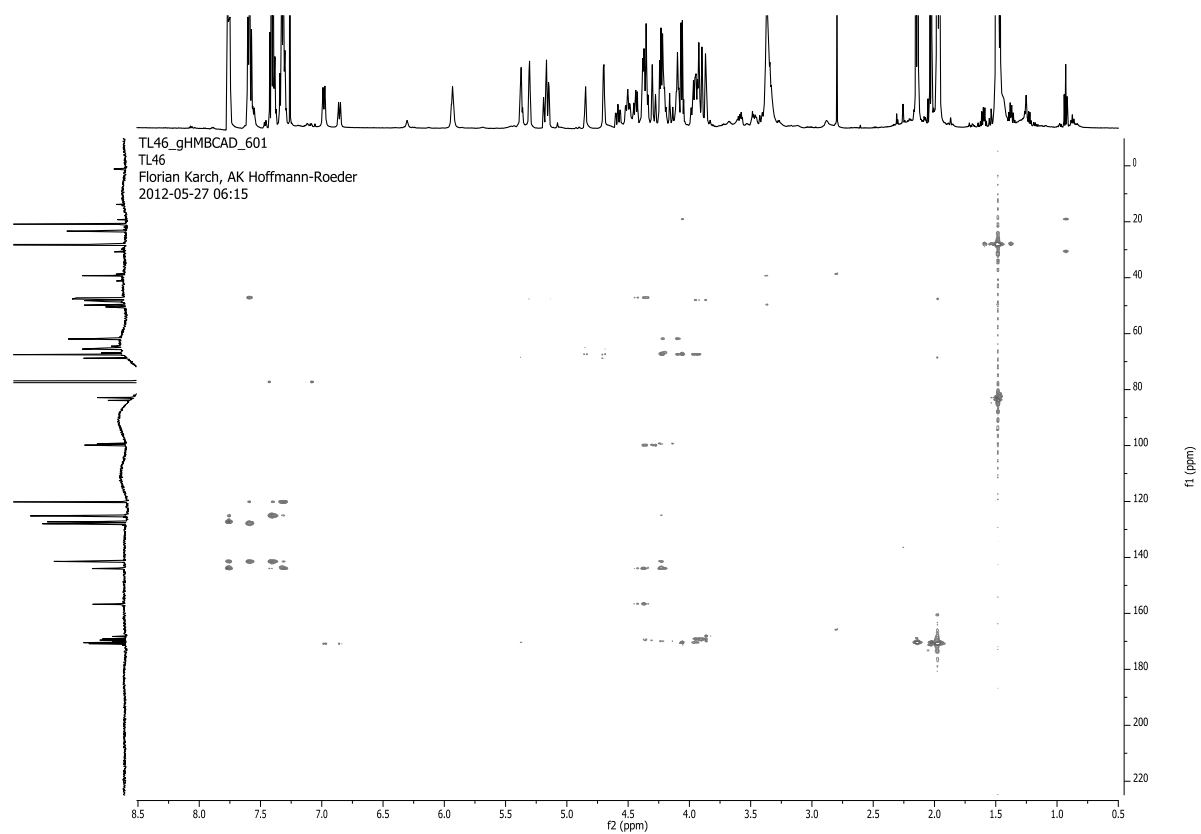
75



TL46\_CARBON\_601  
TL46  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-05-27 00:58





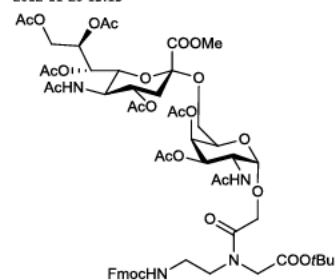
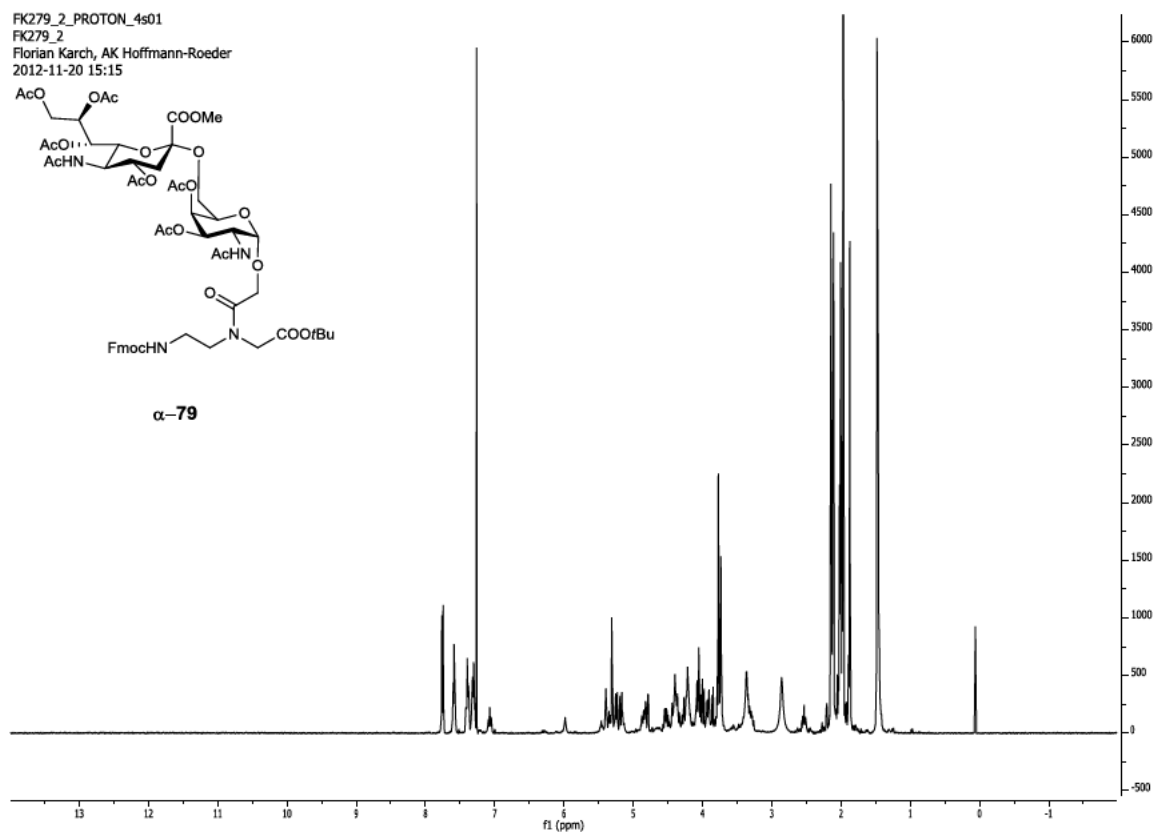


FK279\_2\_PROTON\_4s01

FK279\_2

Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder

2012-11-20 15:15

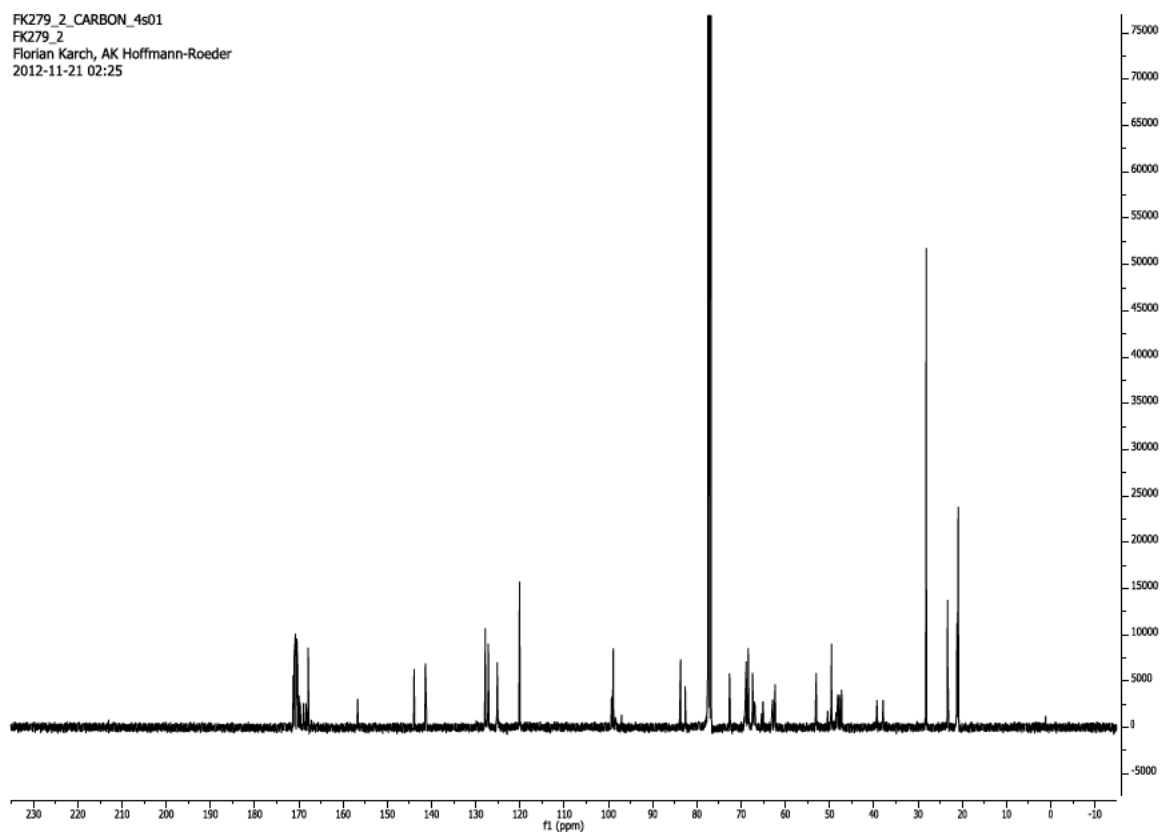

 $\alpha$ -79


FK279\_2\_CARBON\_4s01

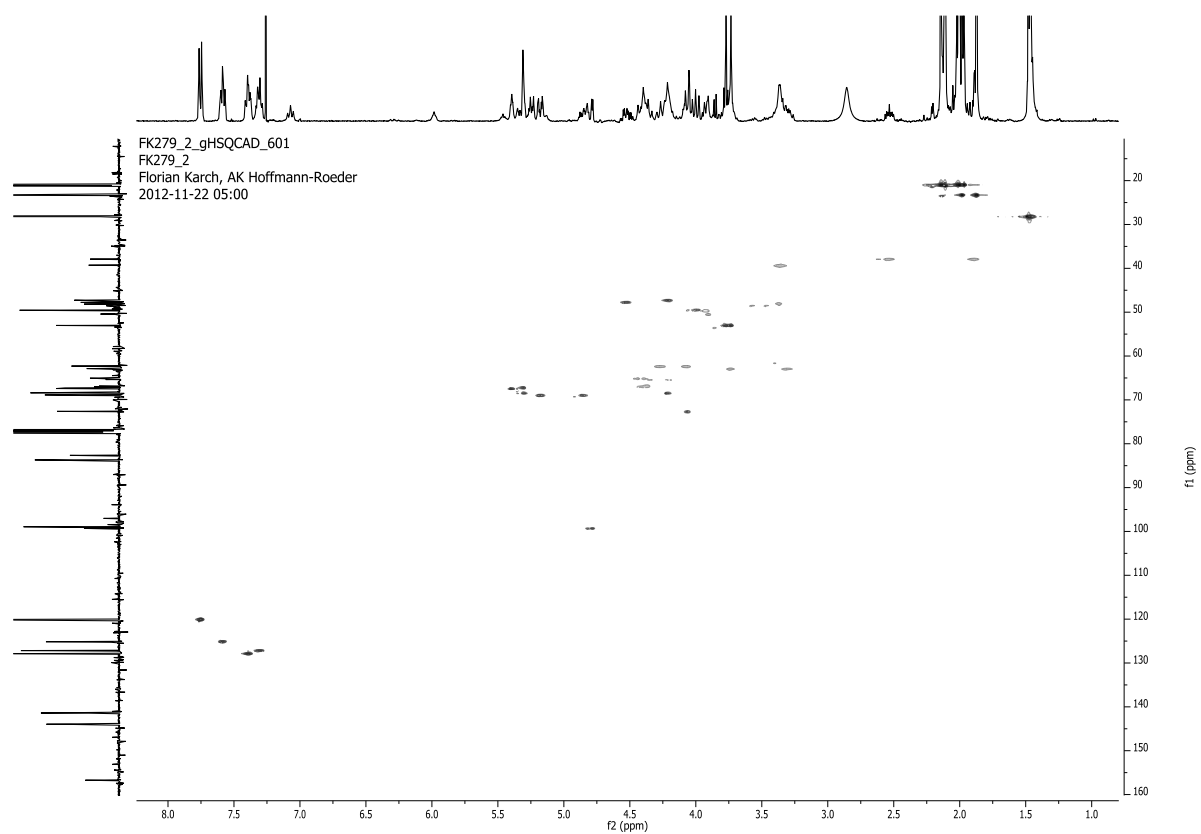
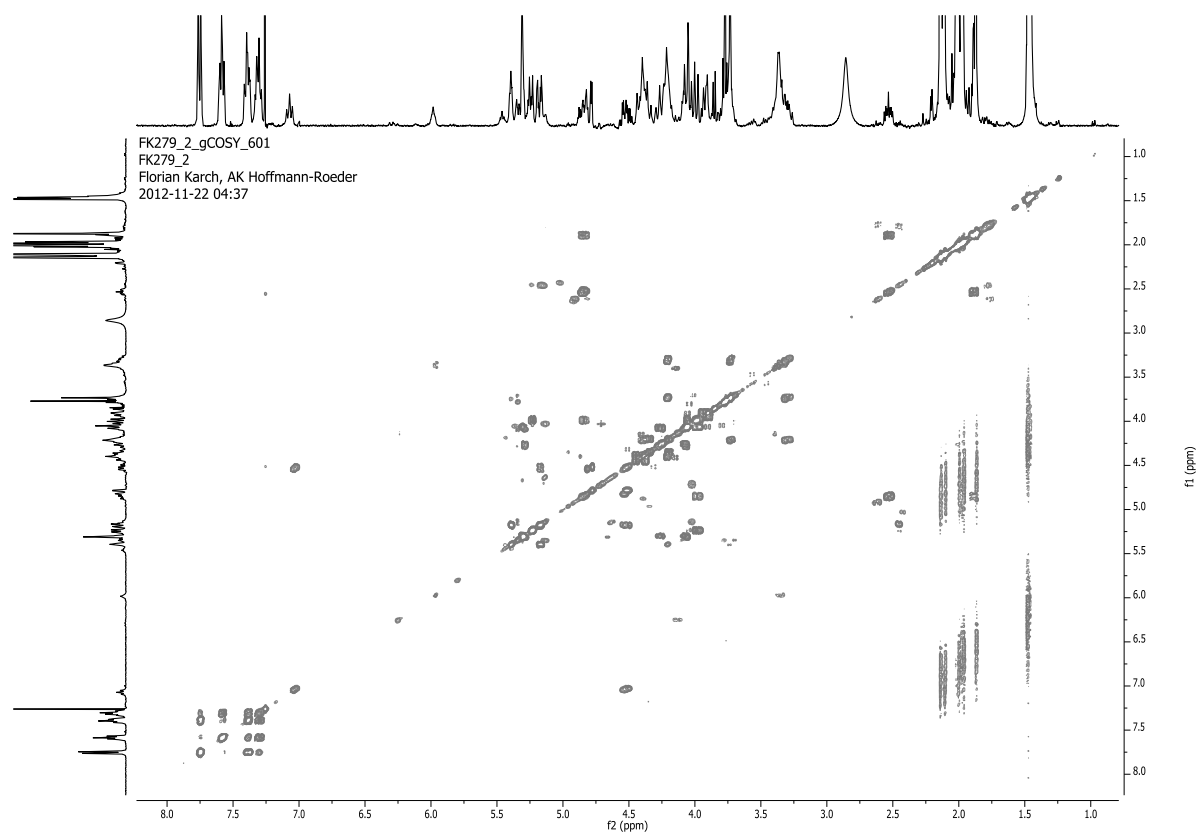
FK279\_2

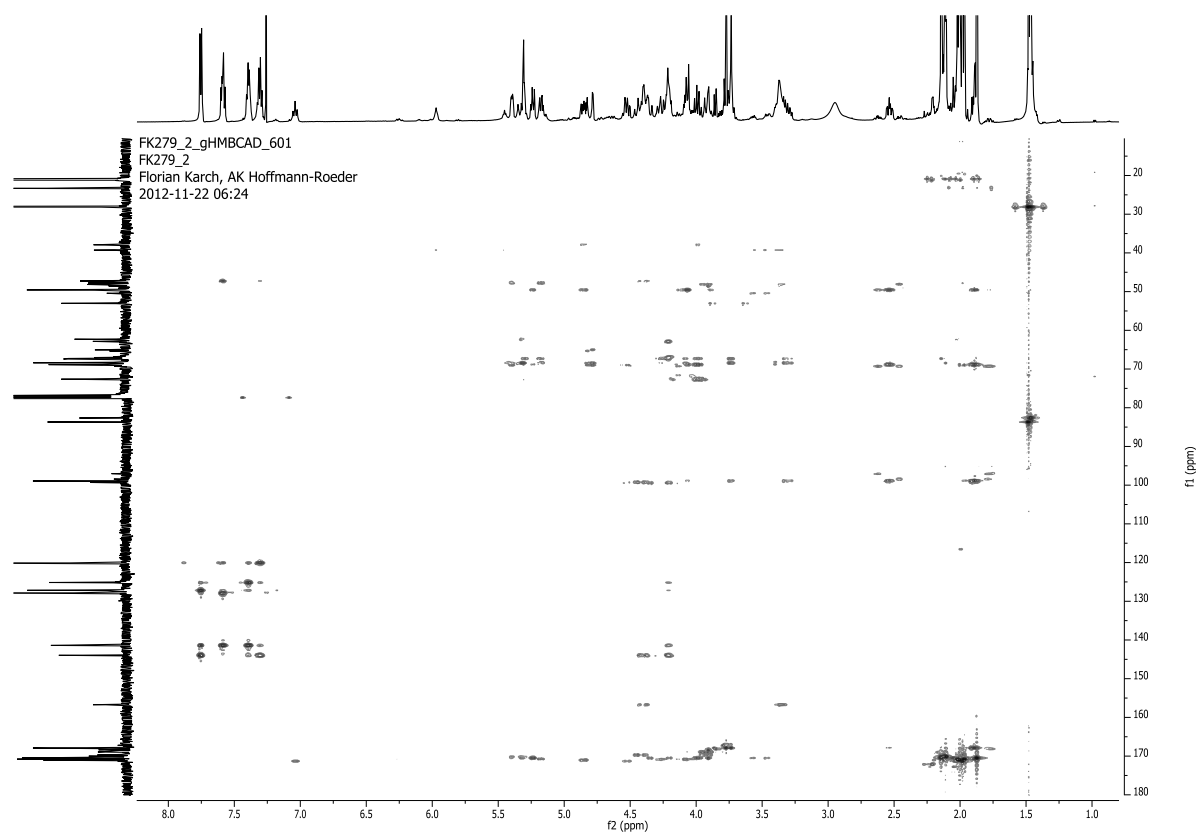
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder

2012-11-21 02:25

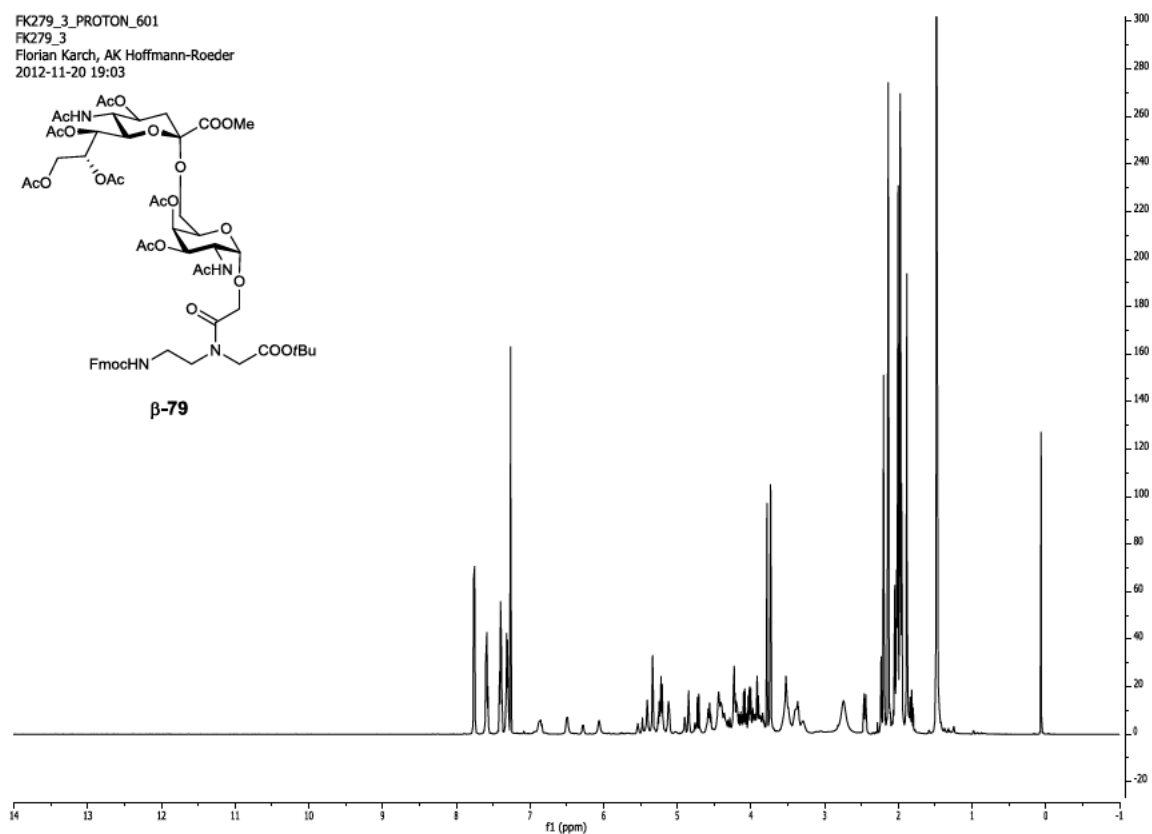
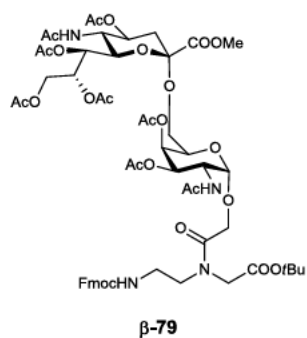




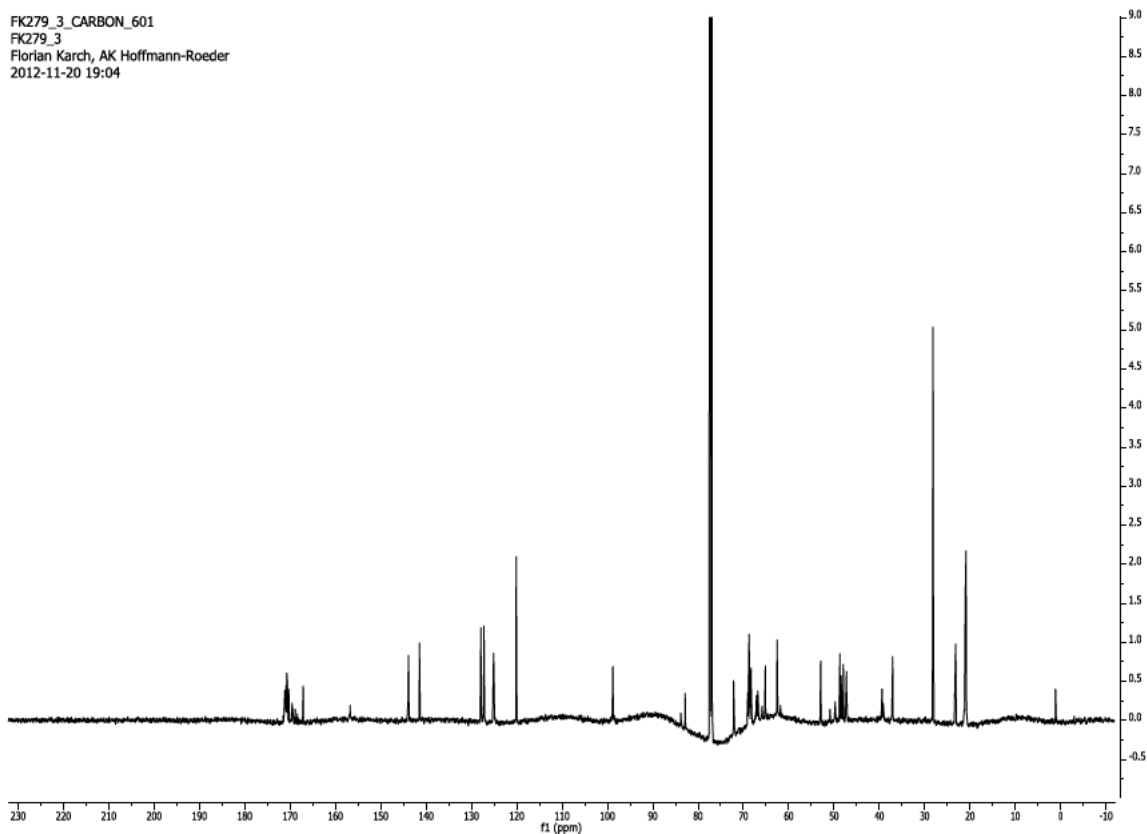


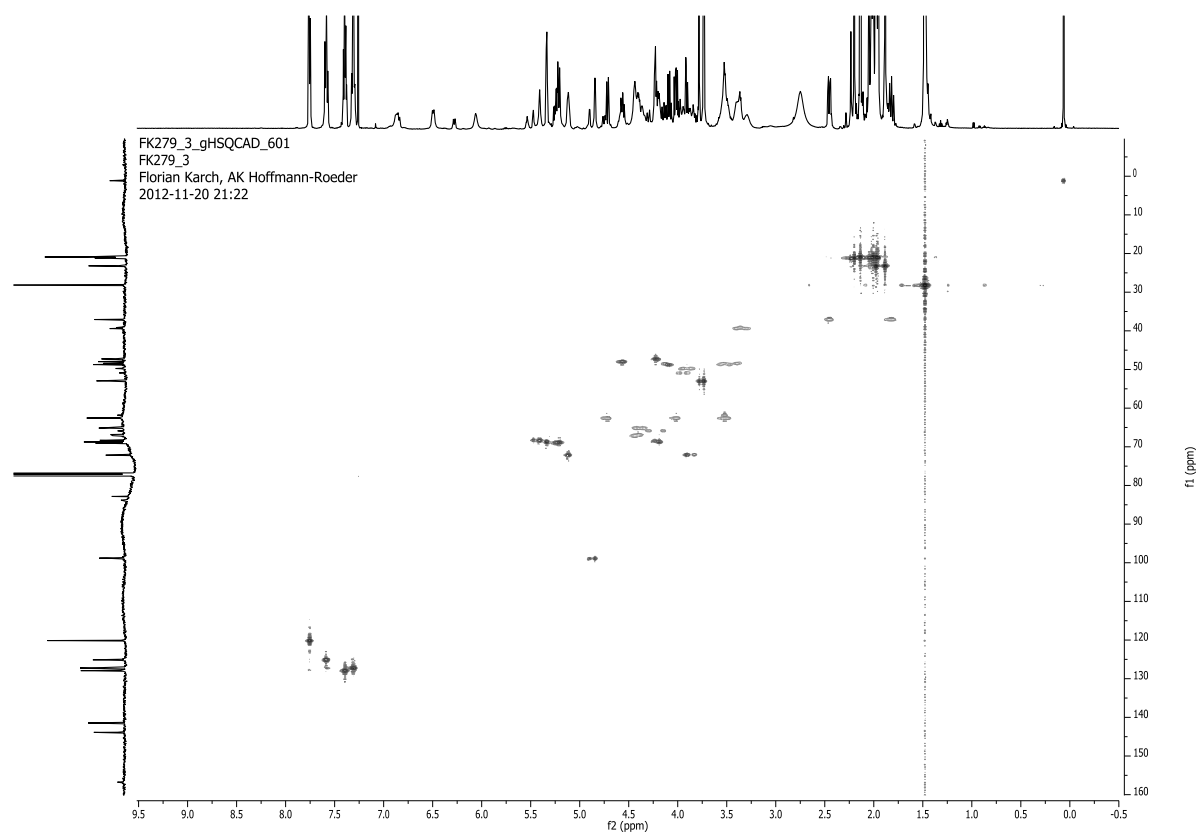
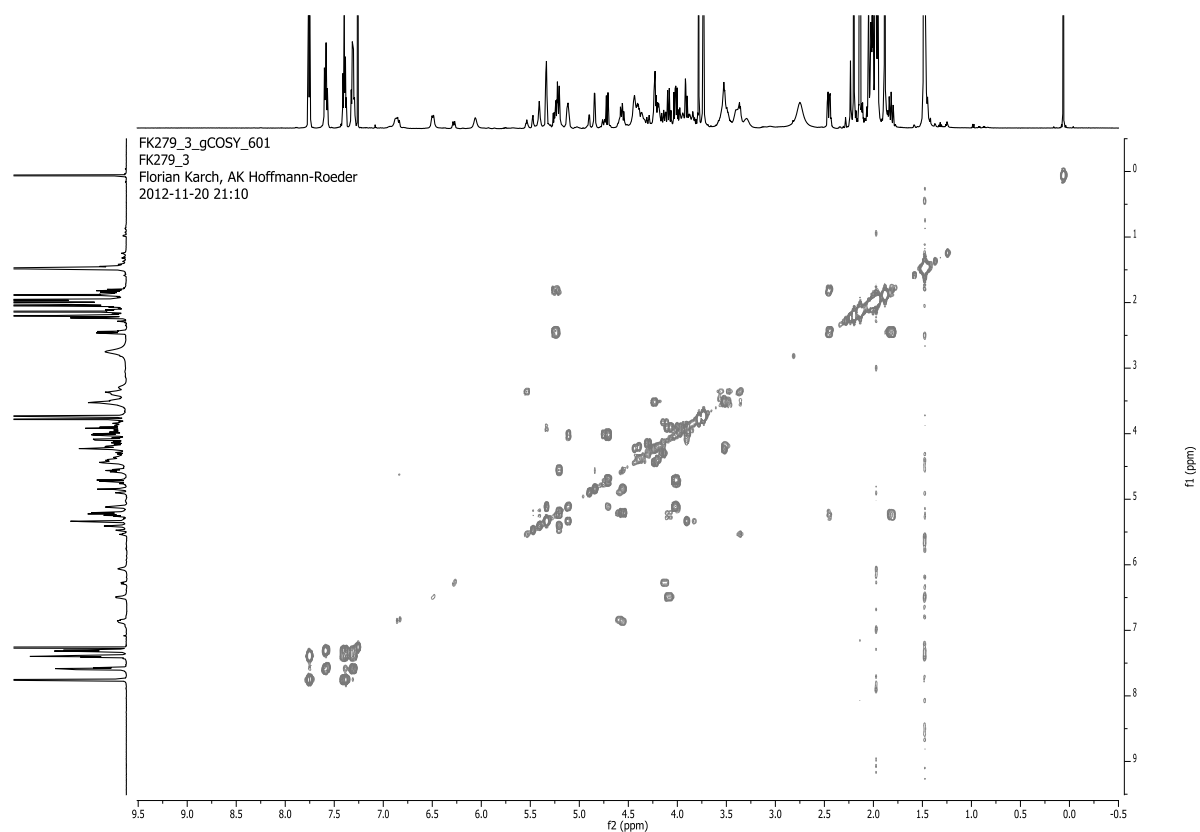


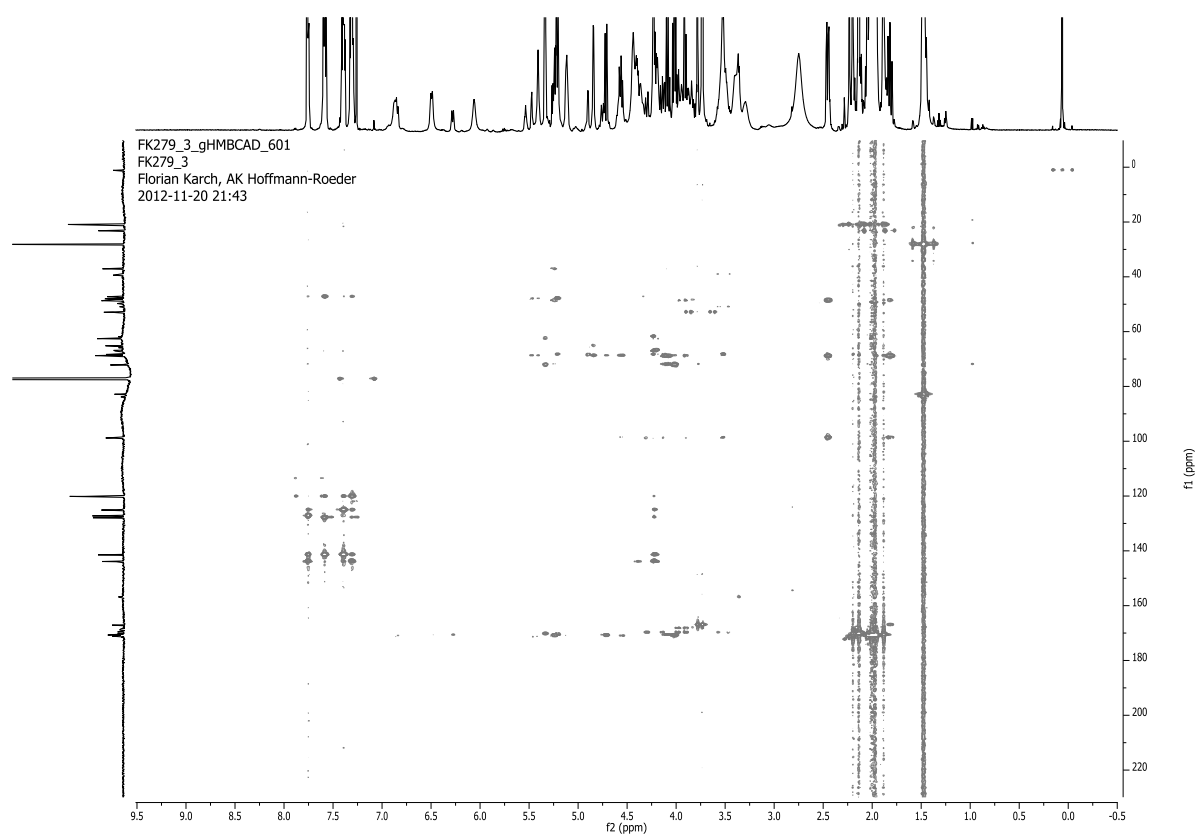
FK279\_3\_PROTON\_601  
FK279\_3  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-11-20 19:03



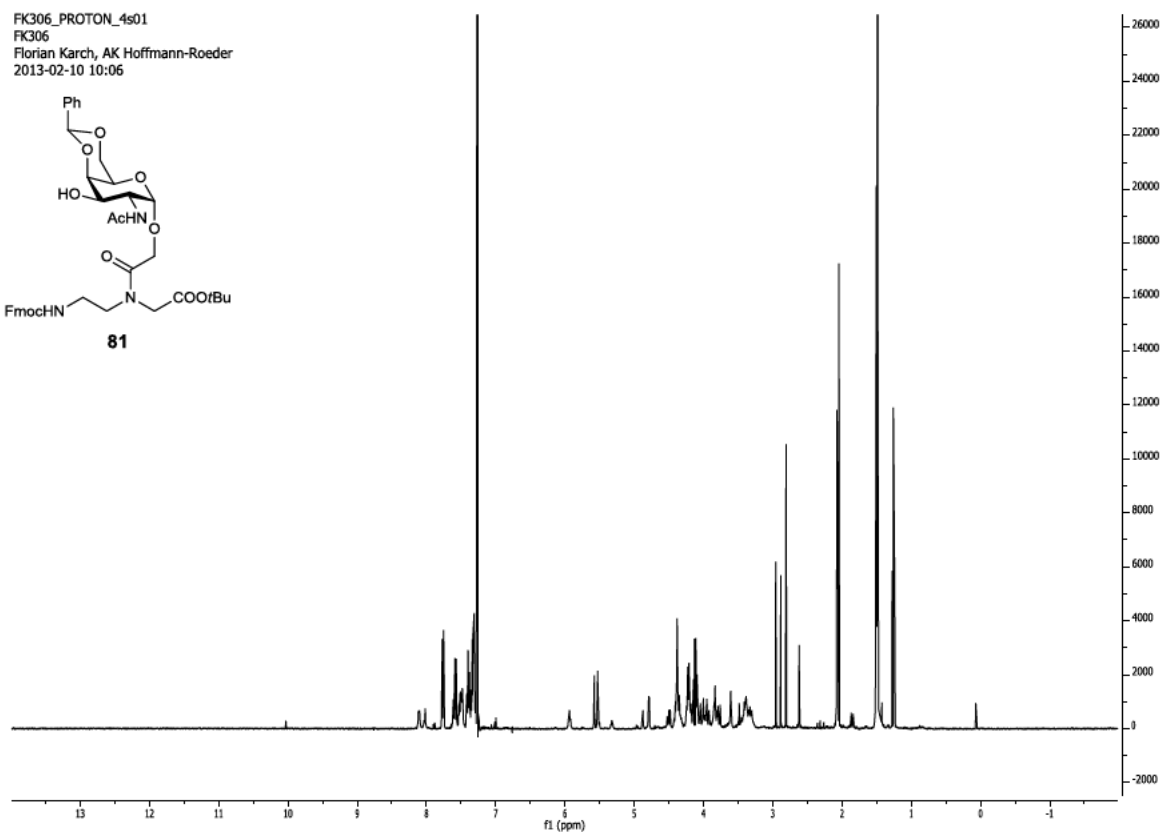
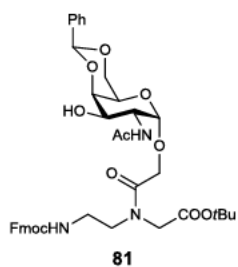
FK279\_3\_CARBON\_601  
FK279\_3  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-11-20 19:04



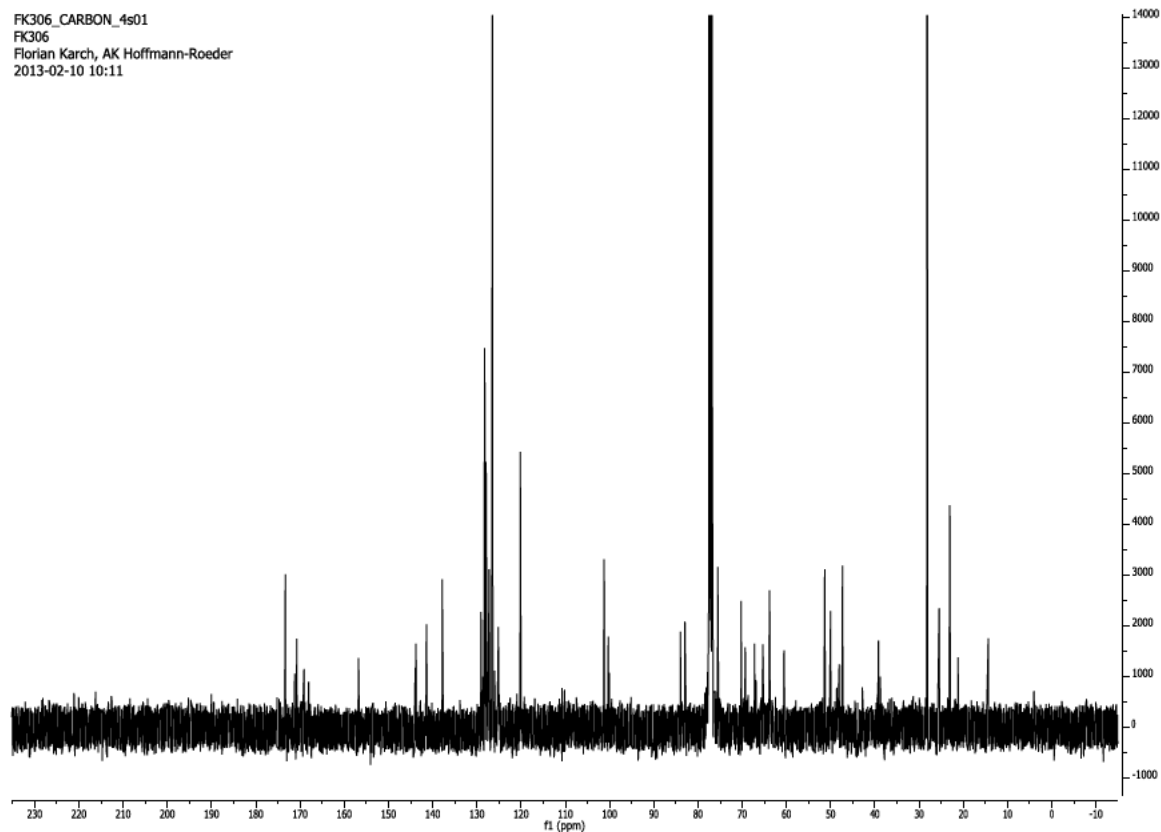


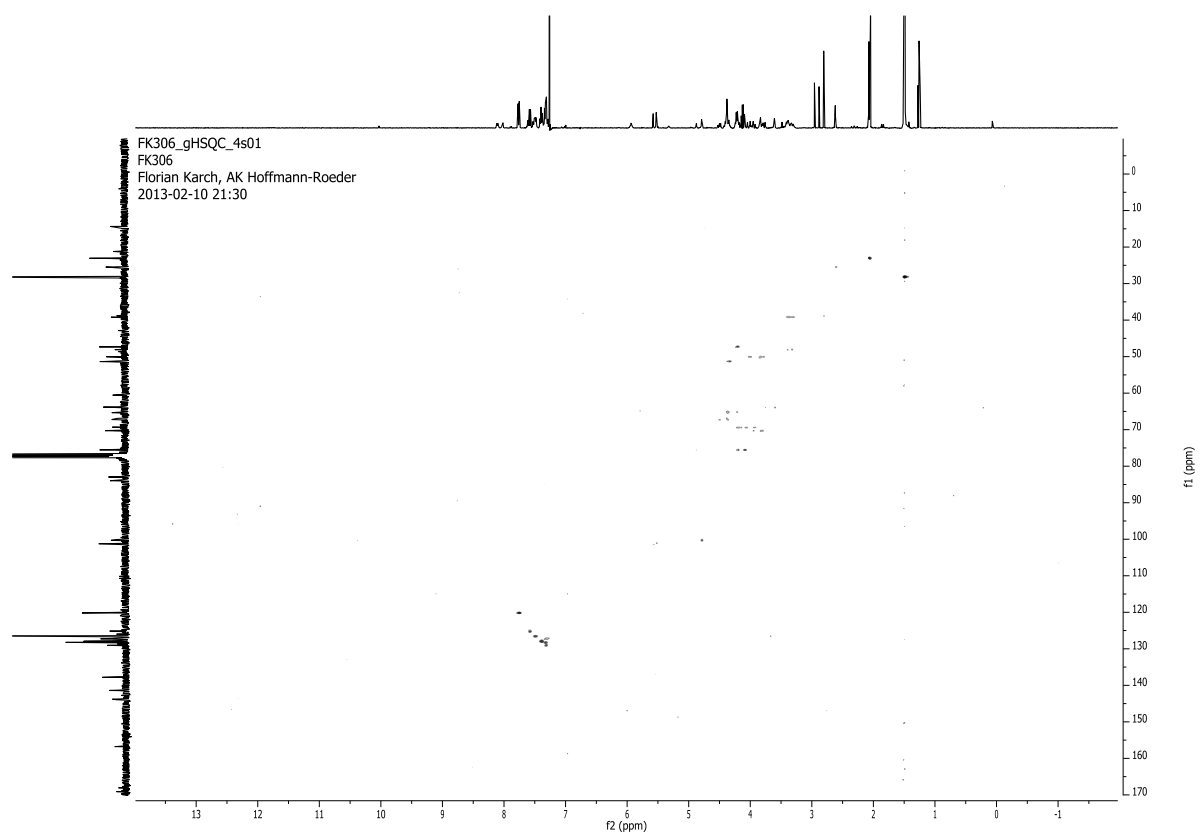
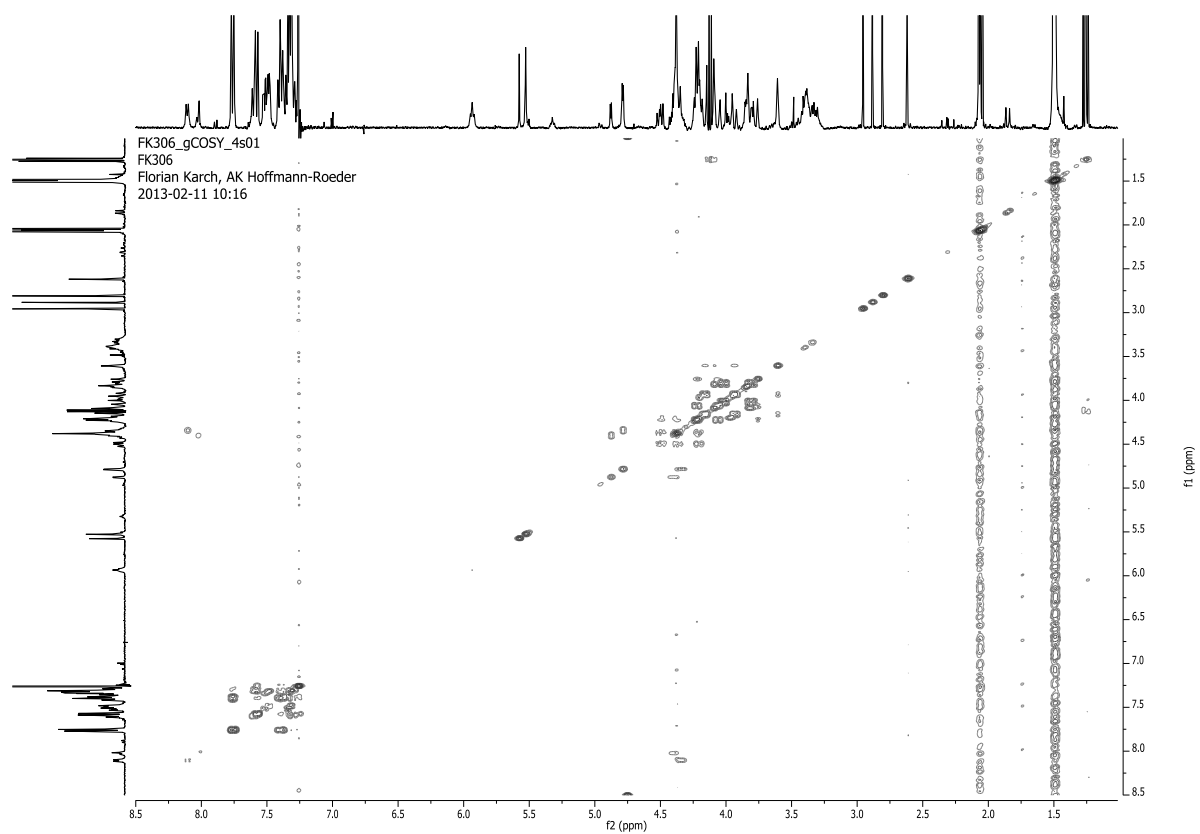


FK306\_PROTON\_4s01  
FK306  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2013-02-10 10:06

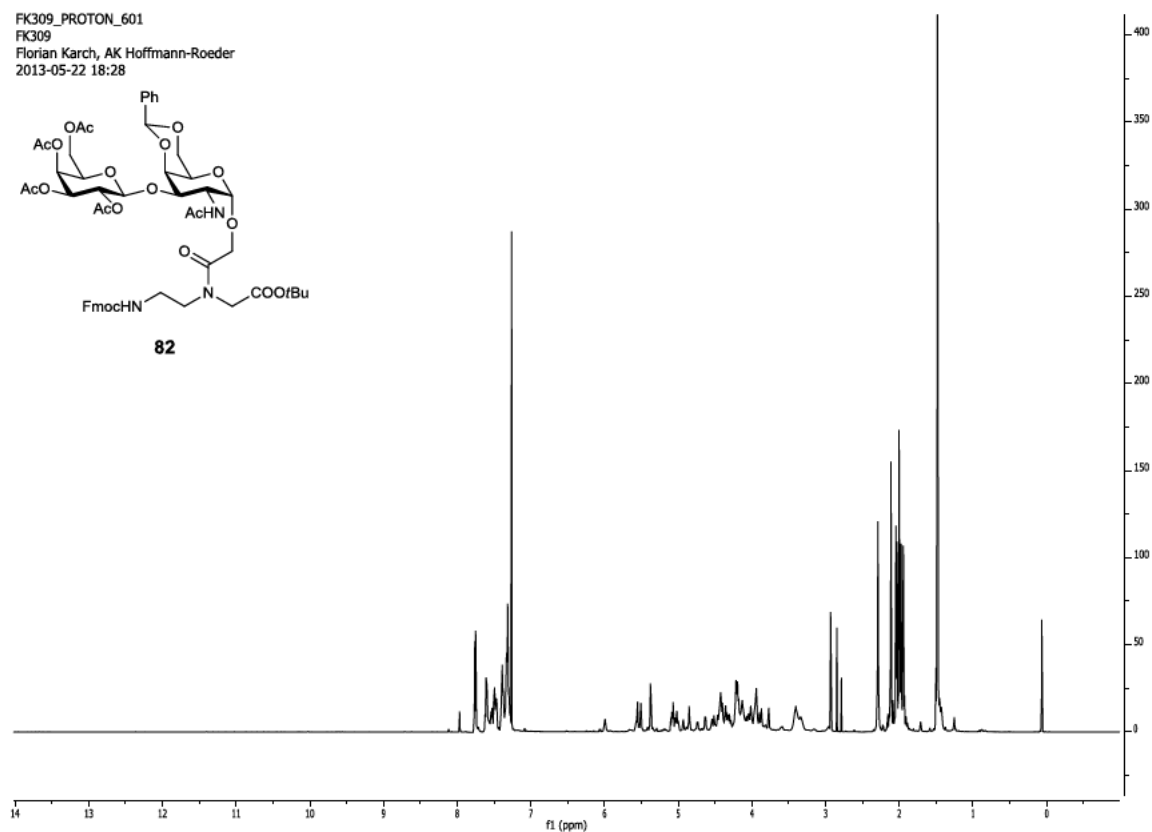
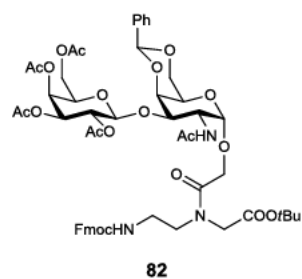


FK306\_CARBON\_4s01  
FK306  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2013-02-10 10:11

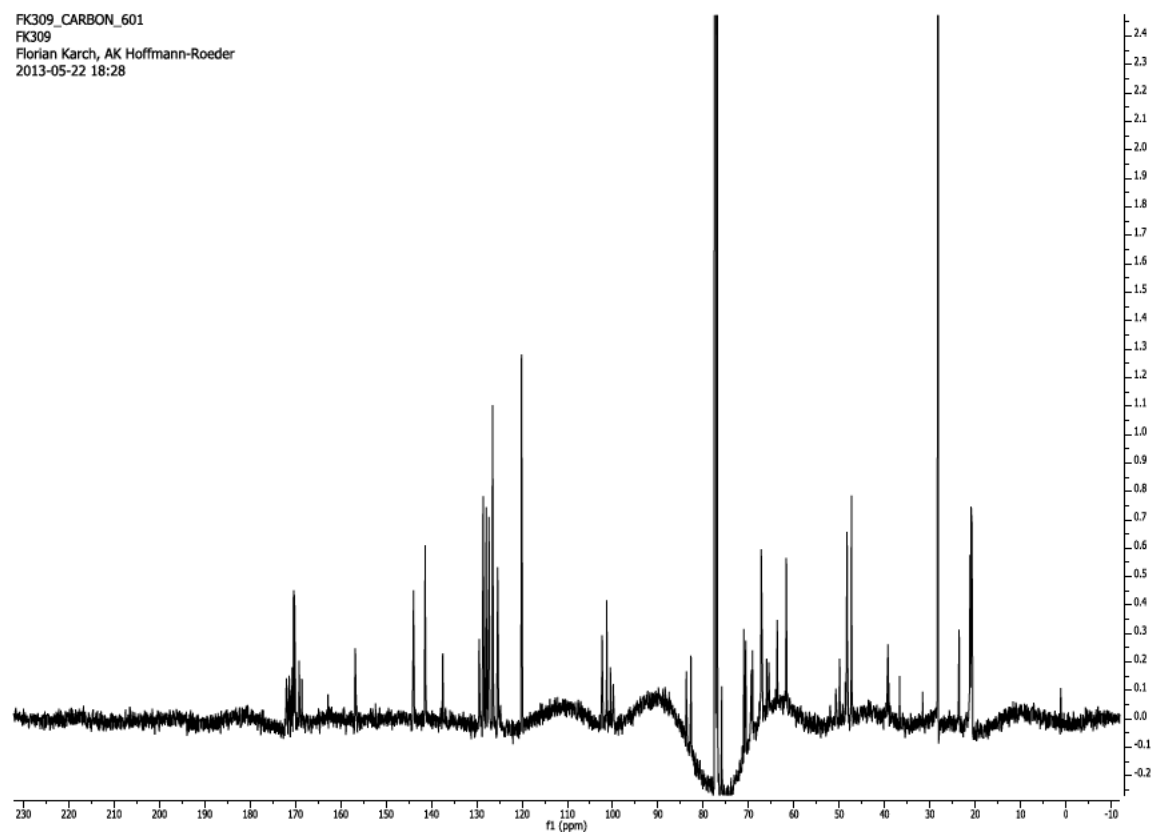




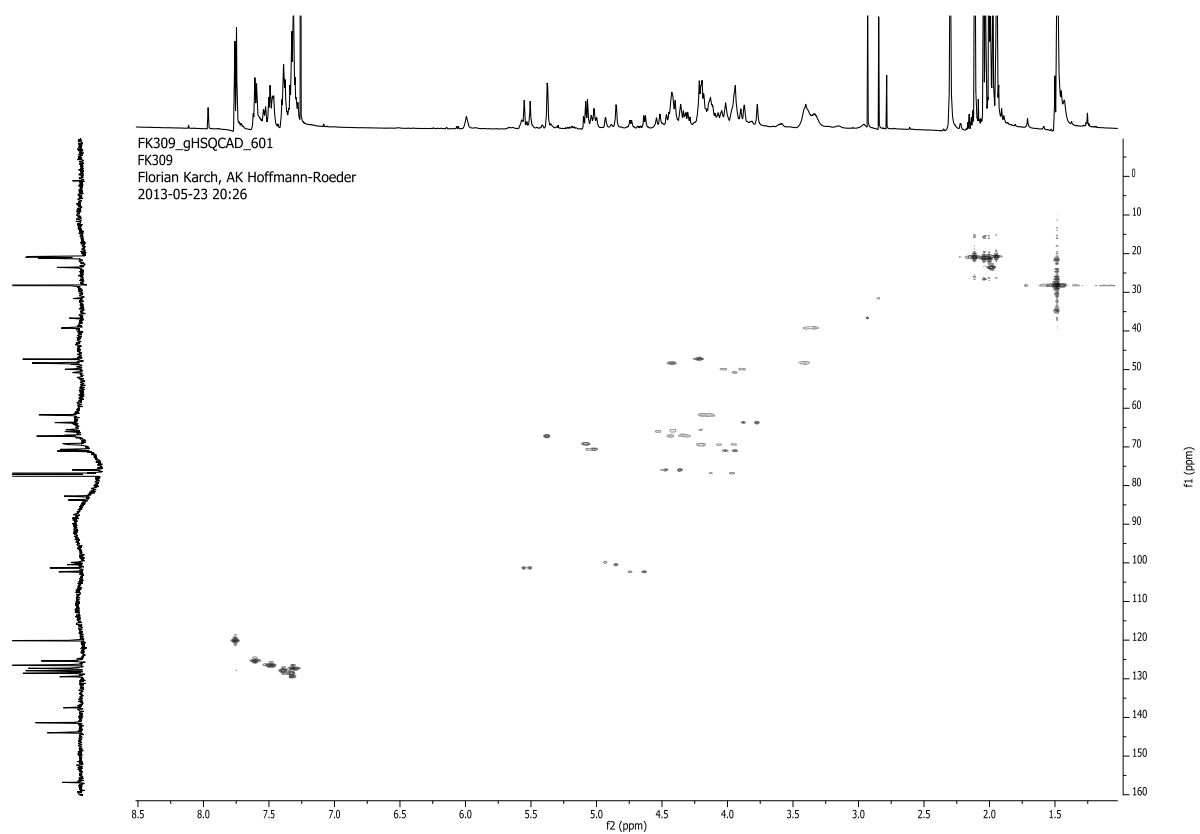
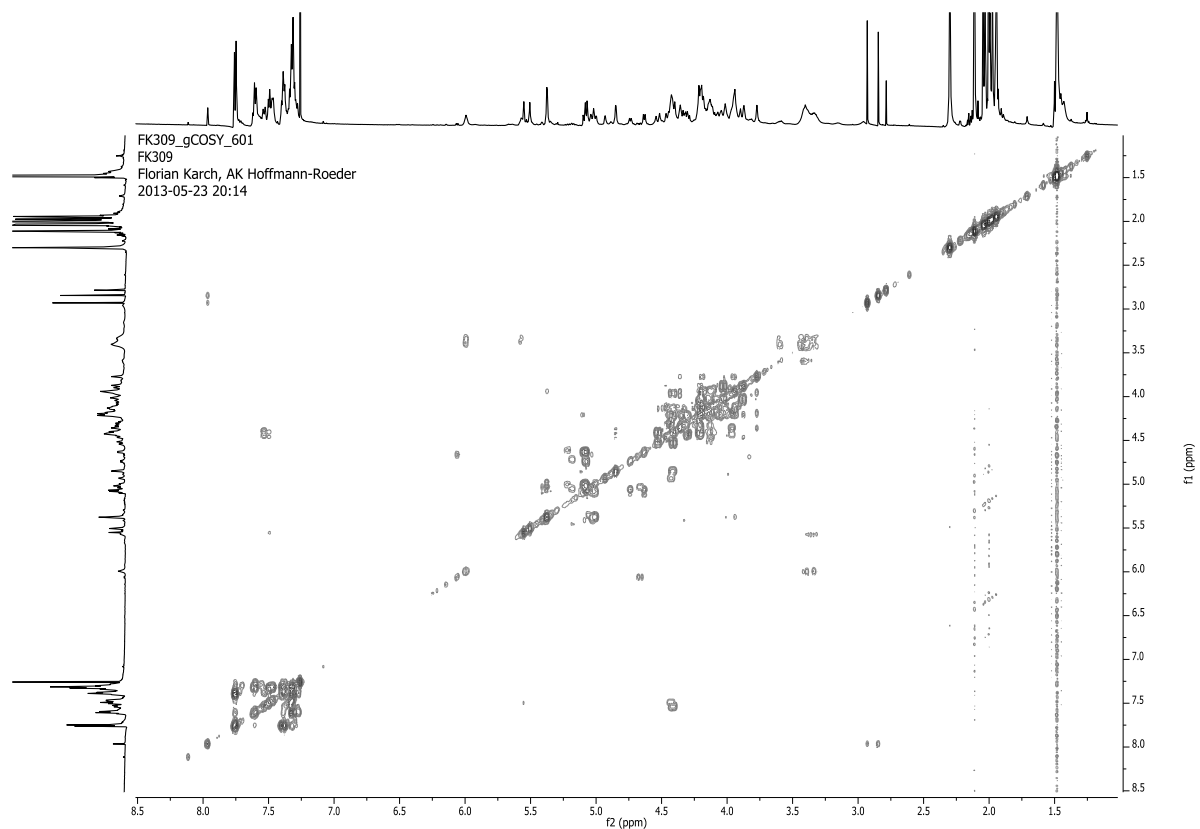
FK309\_PROTON\_601  
FK309  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2013-05-22 18:28

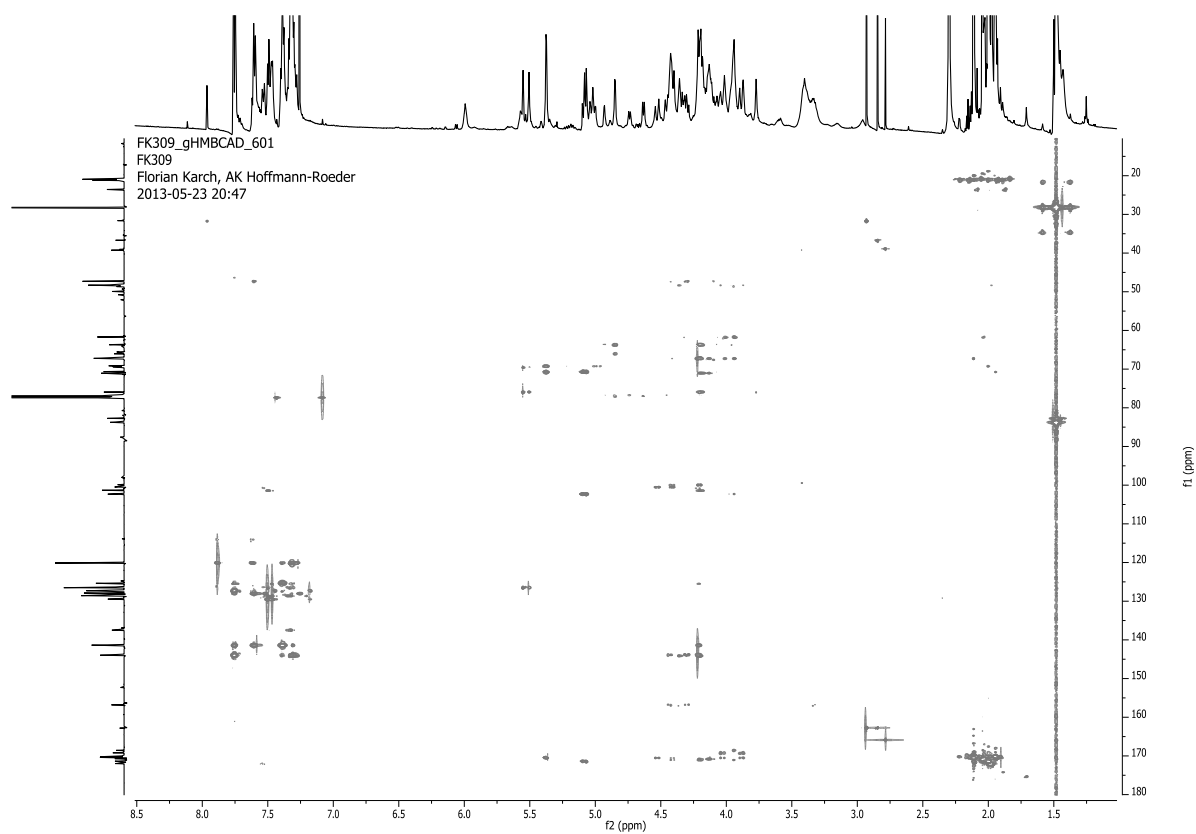


FK309\_CARBON\_601  
FK309  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2013-05-22 18:28

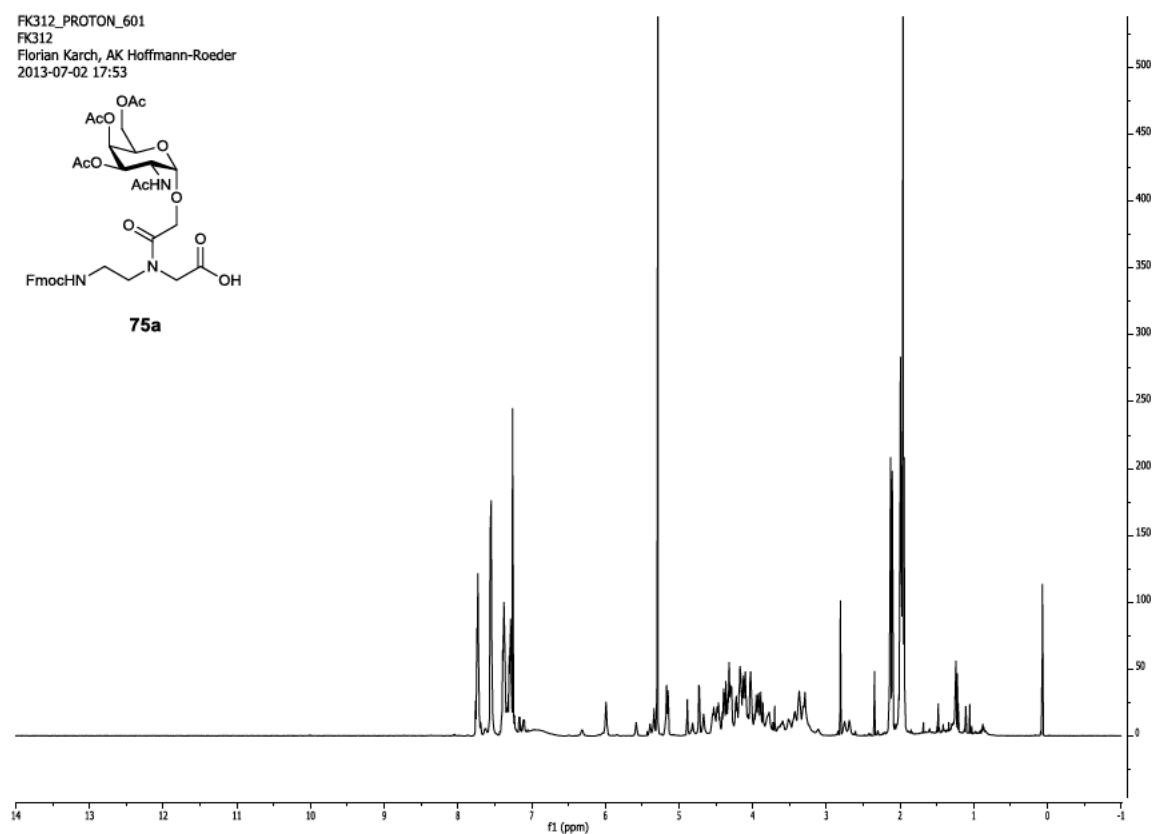
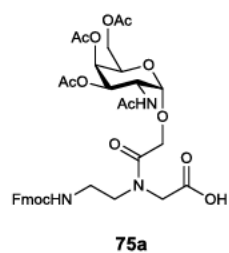




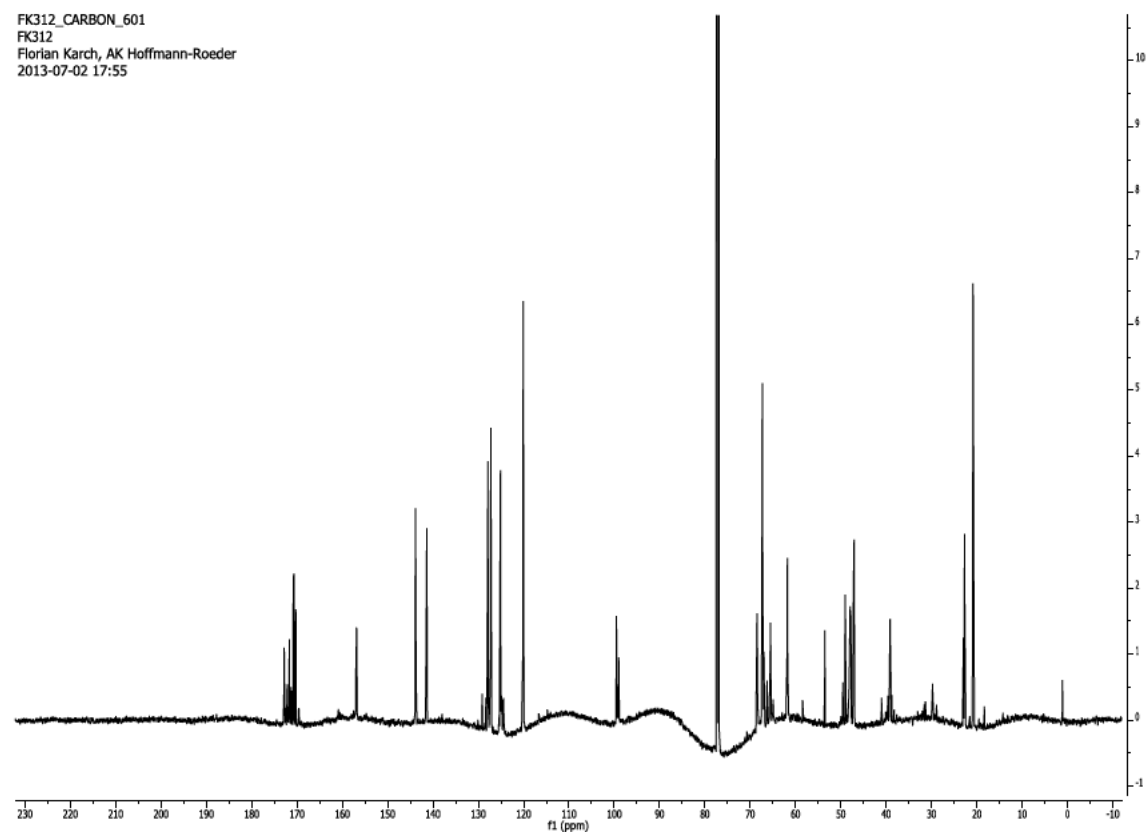


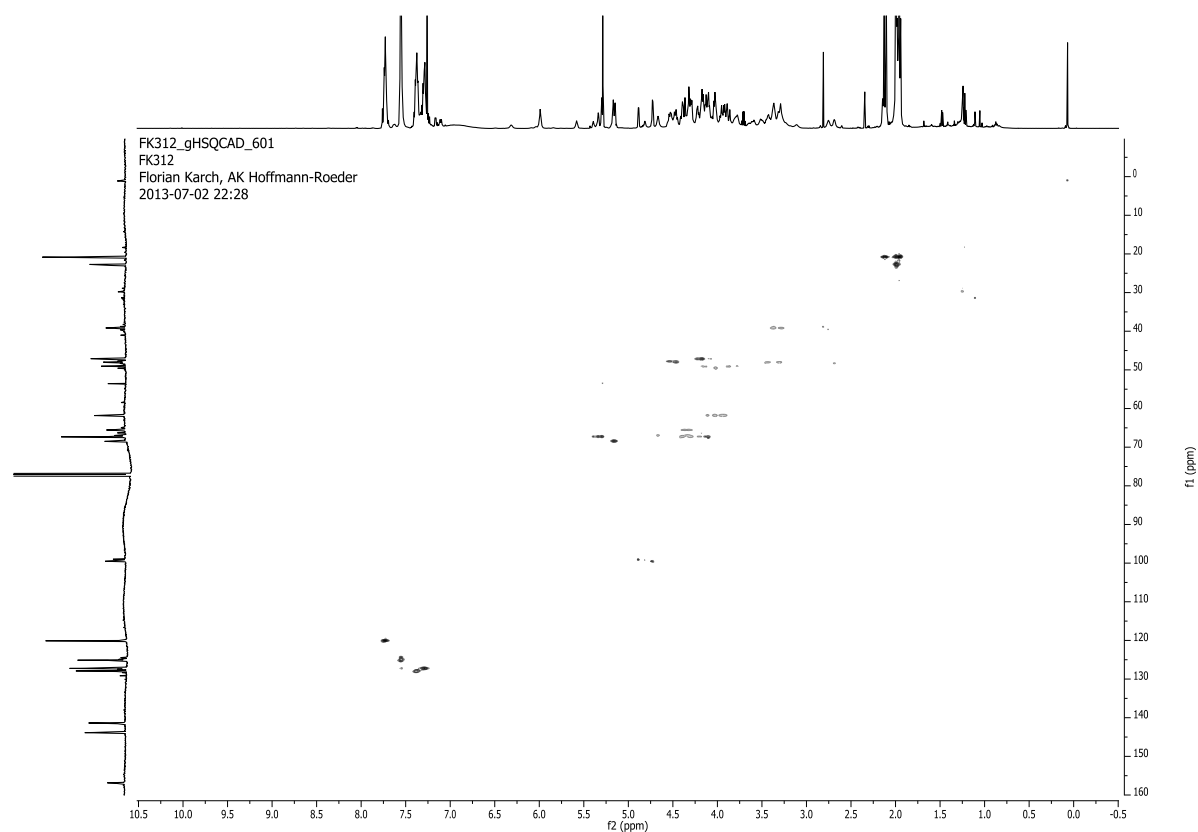
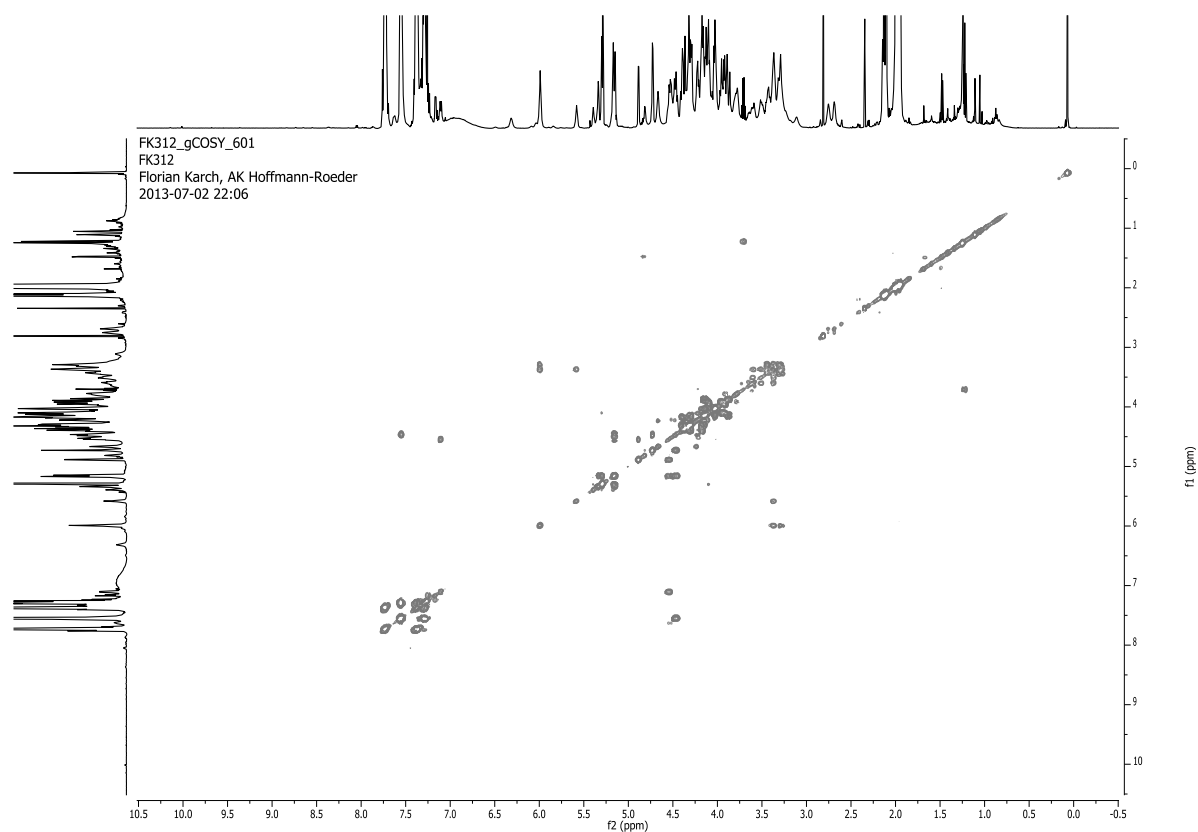


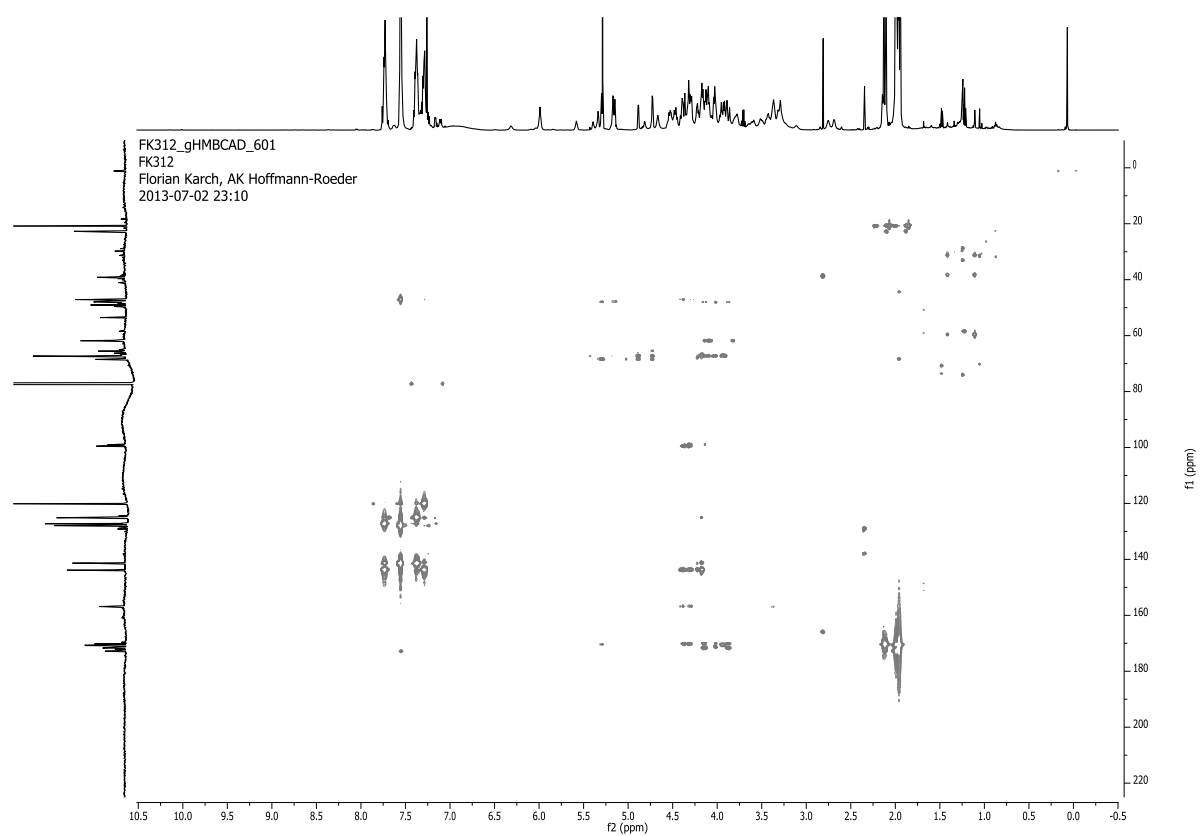
FK312\_PROTON\_601  
FK312  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2013-07-02 17:53



FK312\_CARBON\_601  
FK312  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2013-07-02 17:55





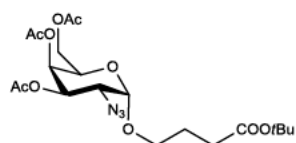


FK247\_PROTON\_4r01

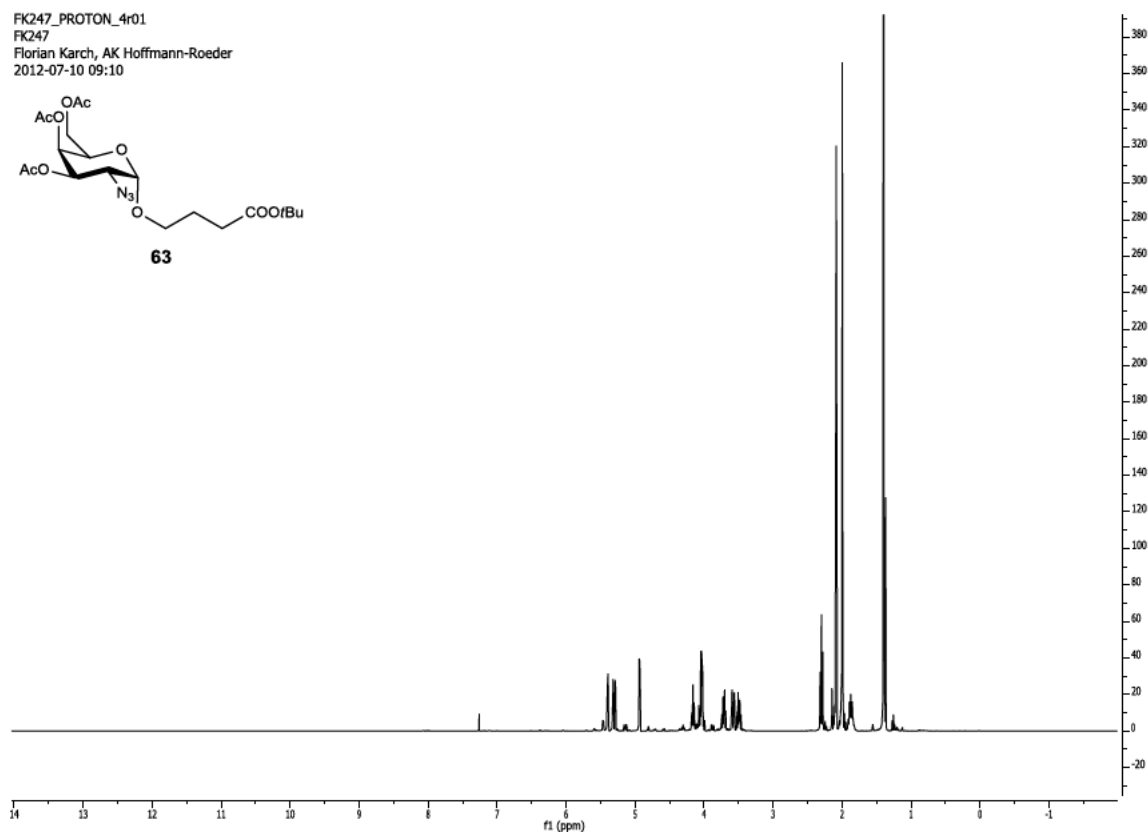
FK247

Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder

2012-07-10 09:10



63

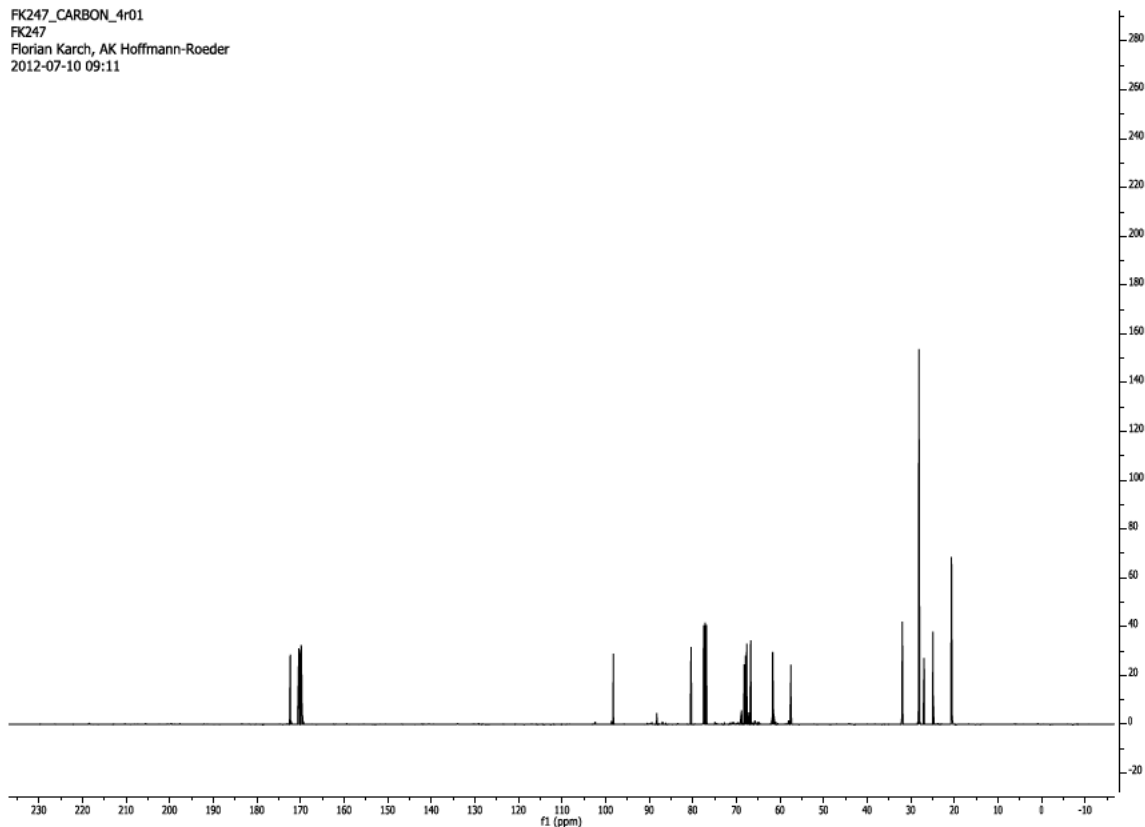


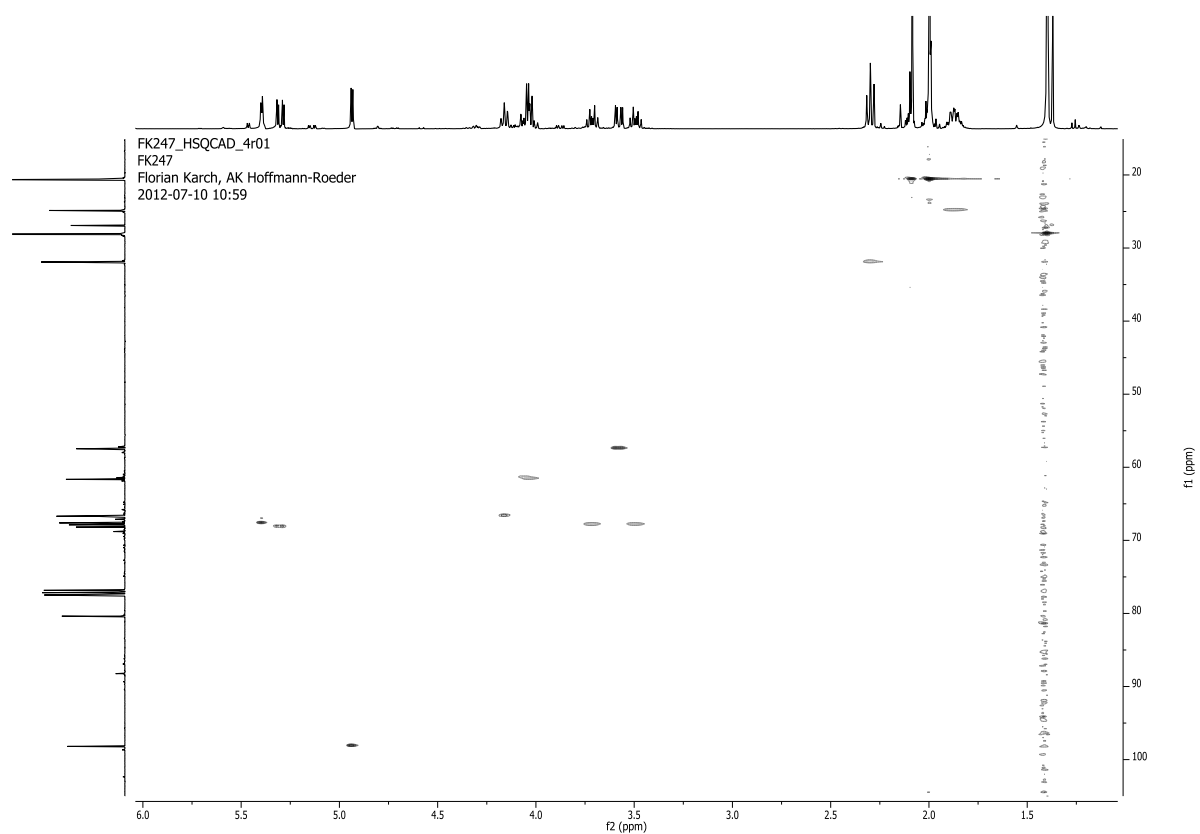
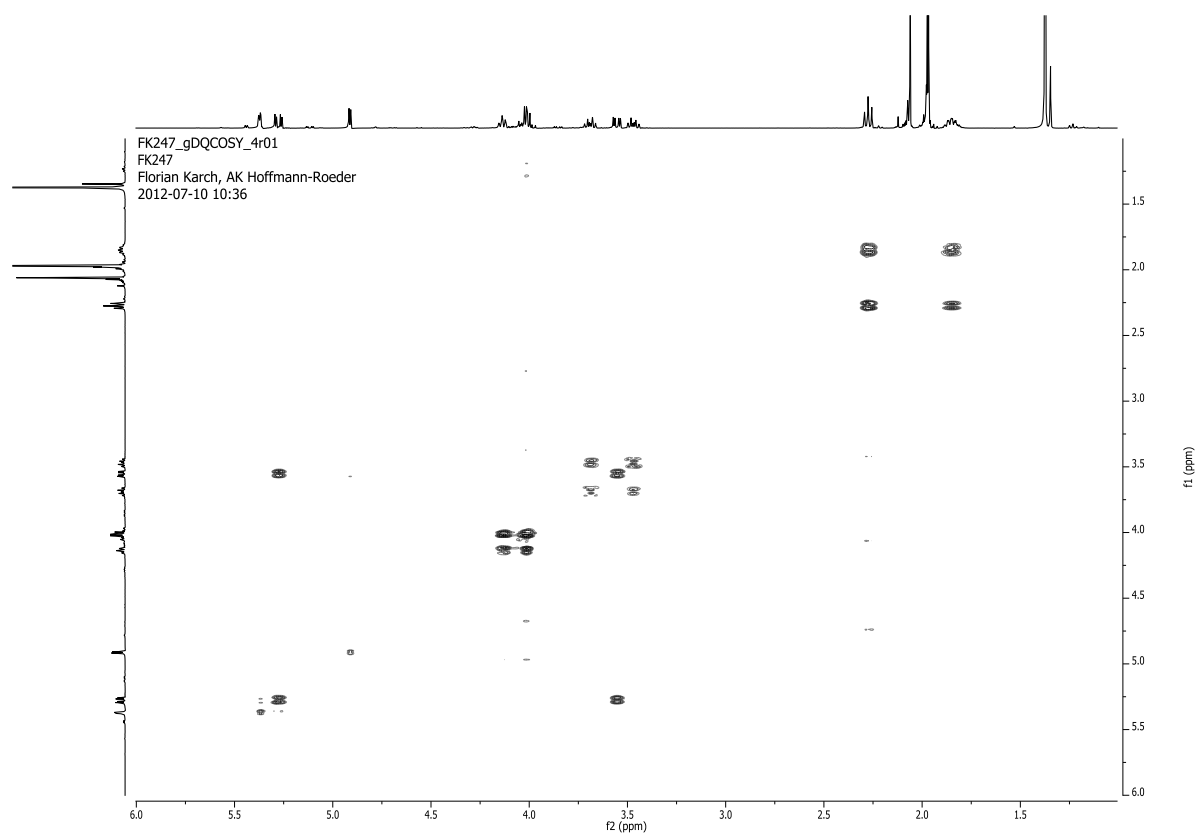
FK247\_CARBON\_4r01

FK247

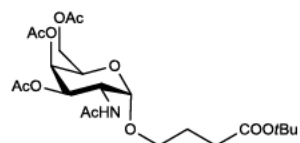
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder

2012-07-10 09:11

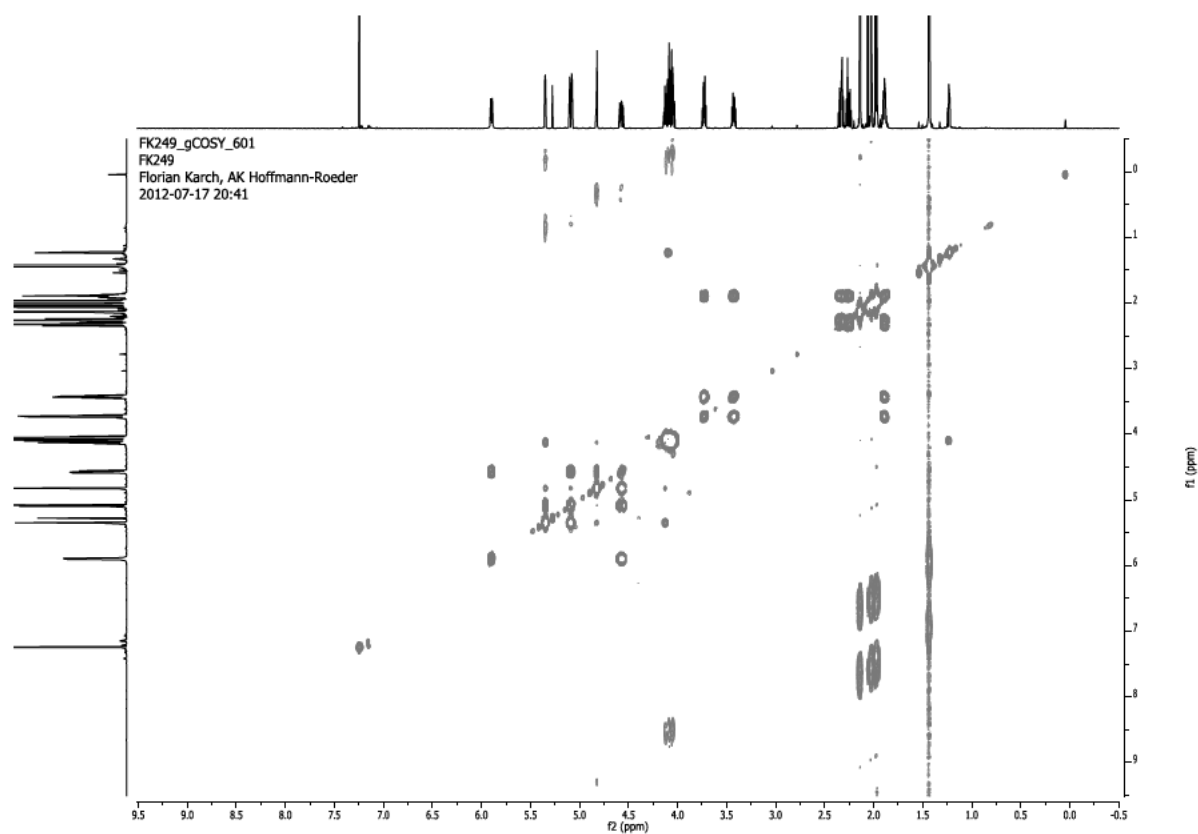
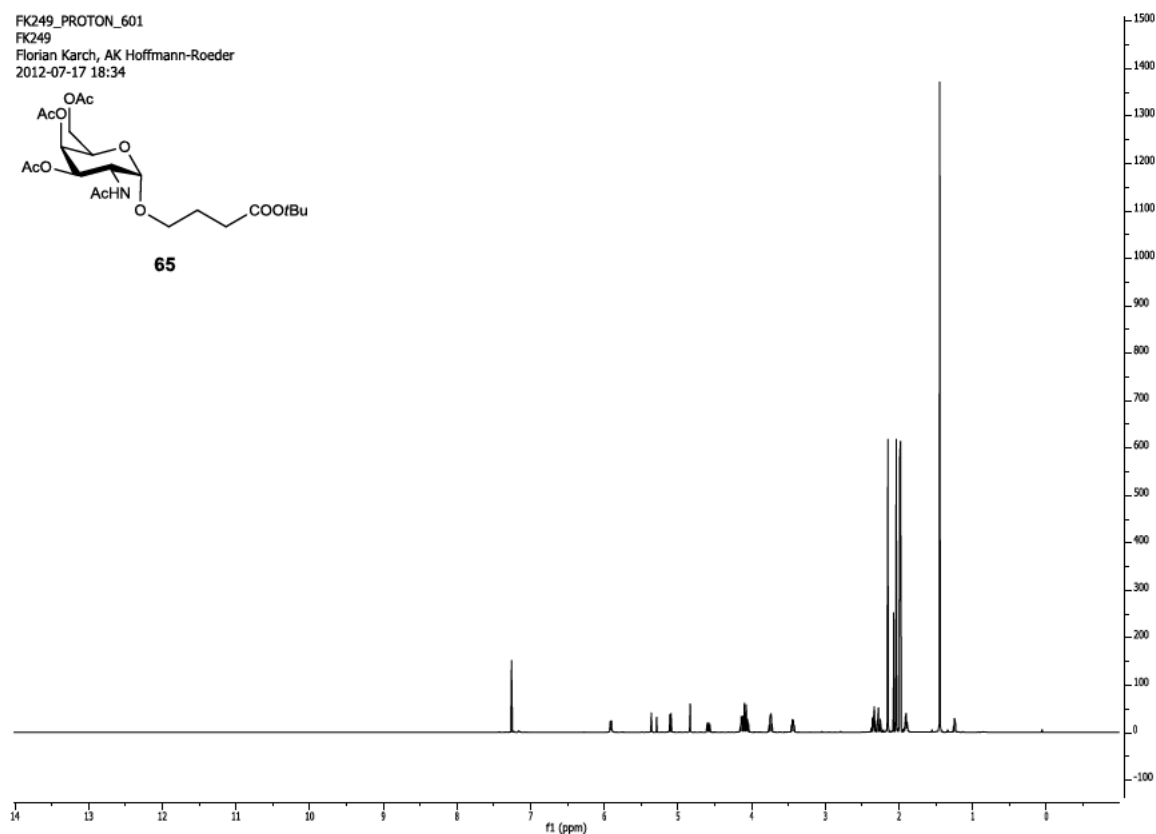




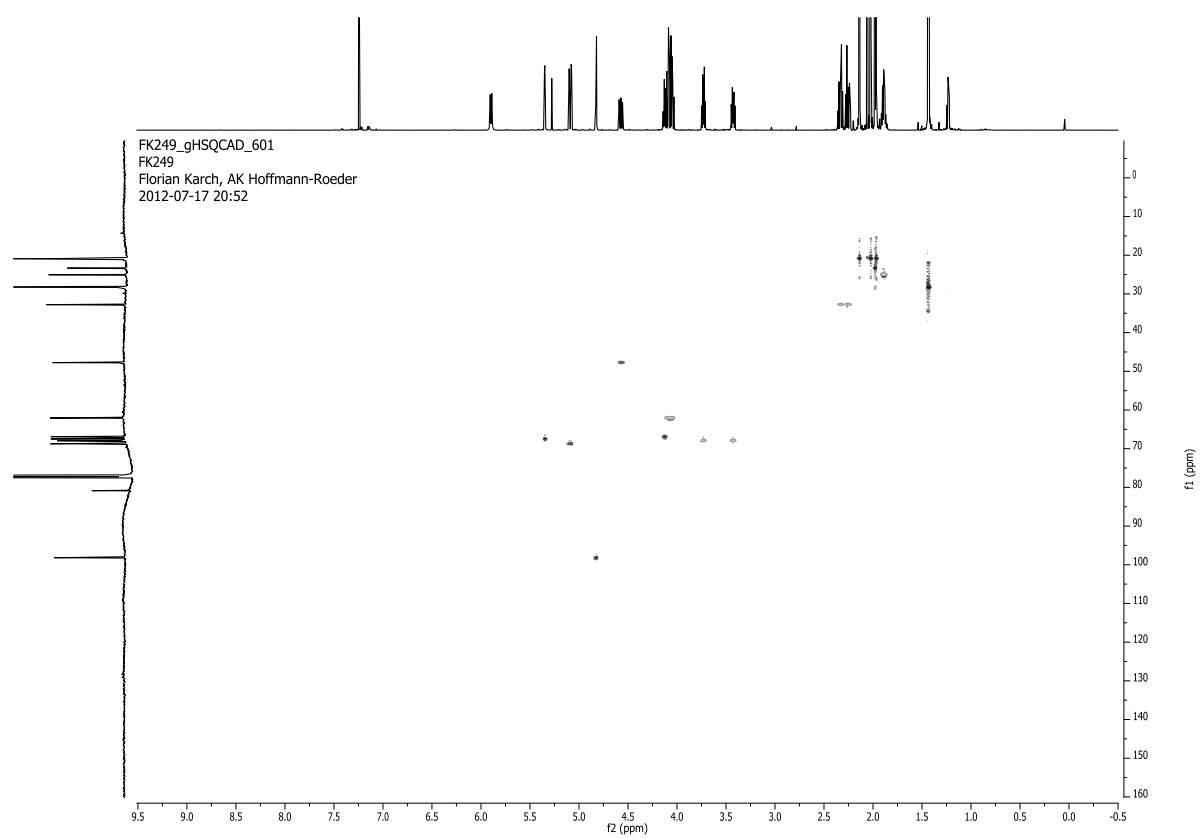
FK249\_PROTON\_601  
FK249  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-07-17 18:34



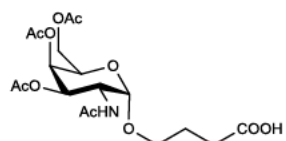
65



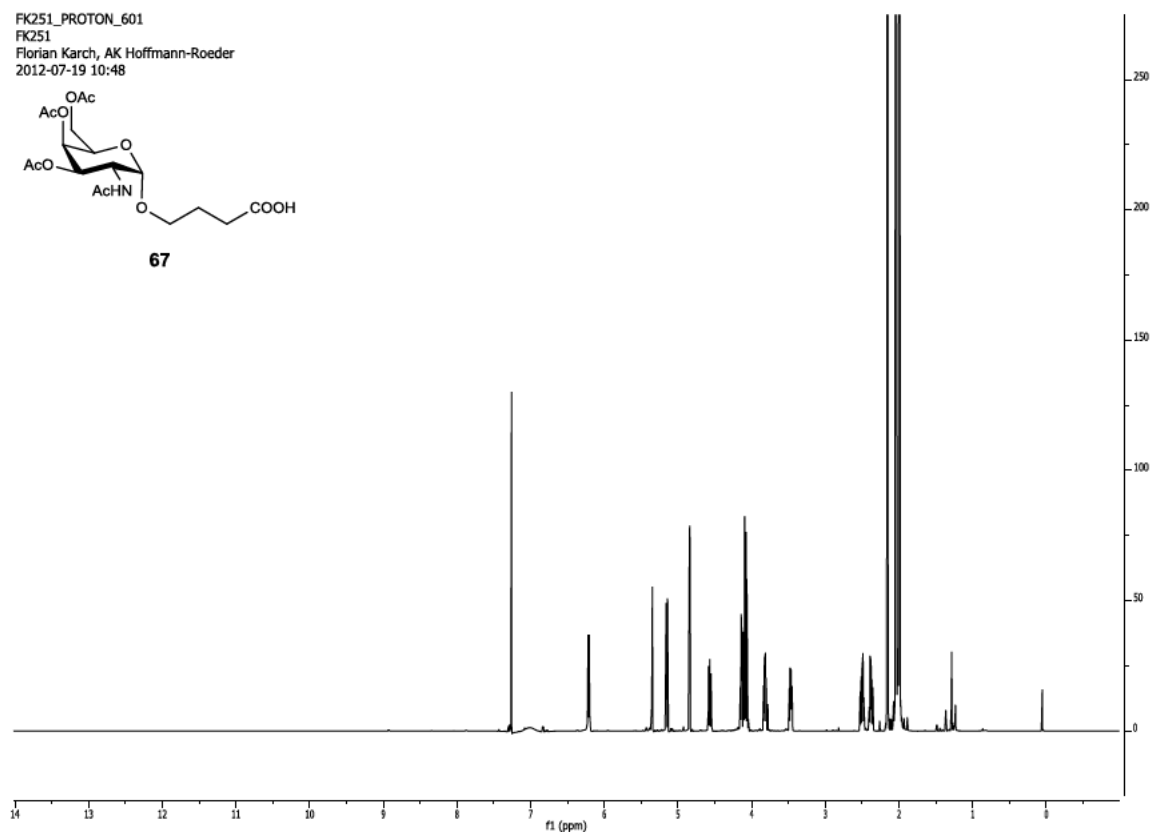




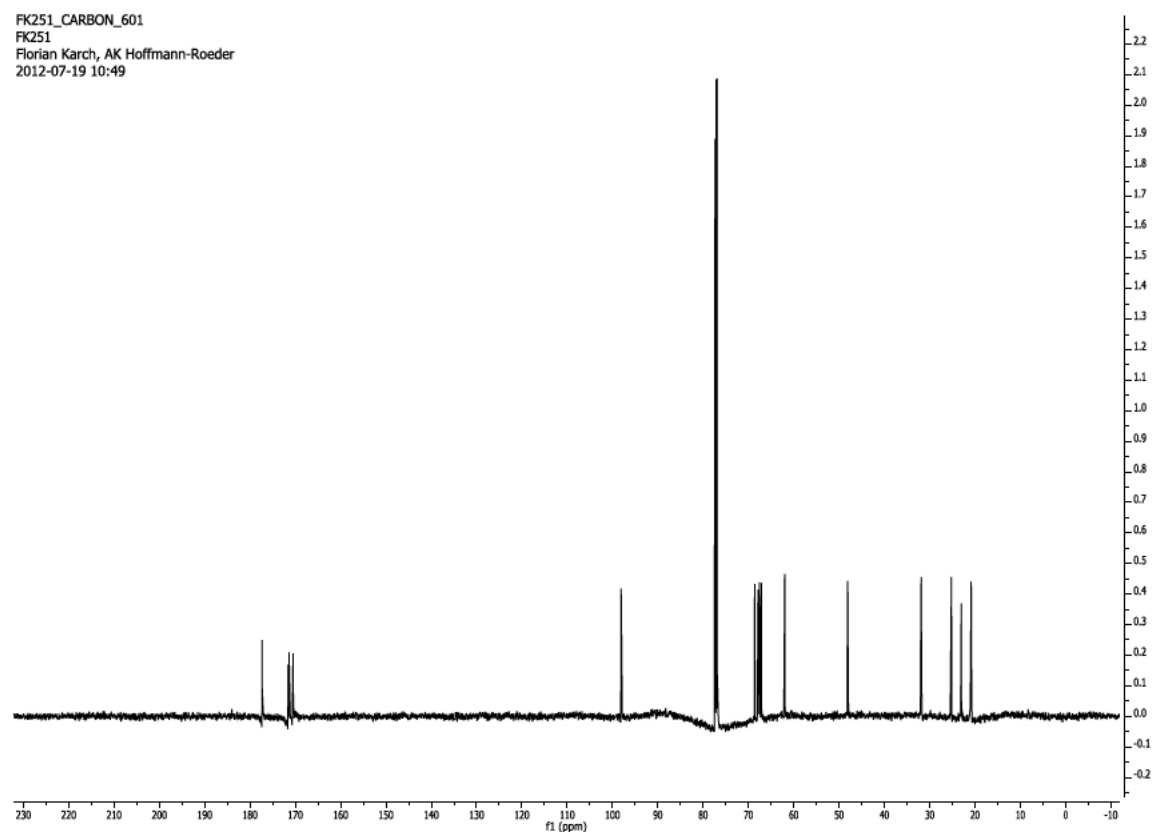
FK251\_PROTON\_601  
FK251  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-07-19 10:48



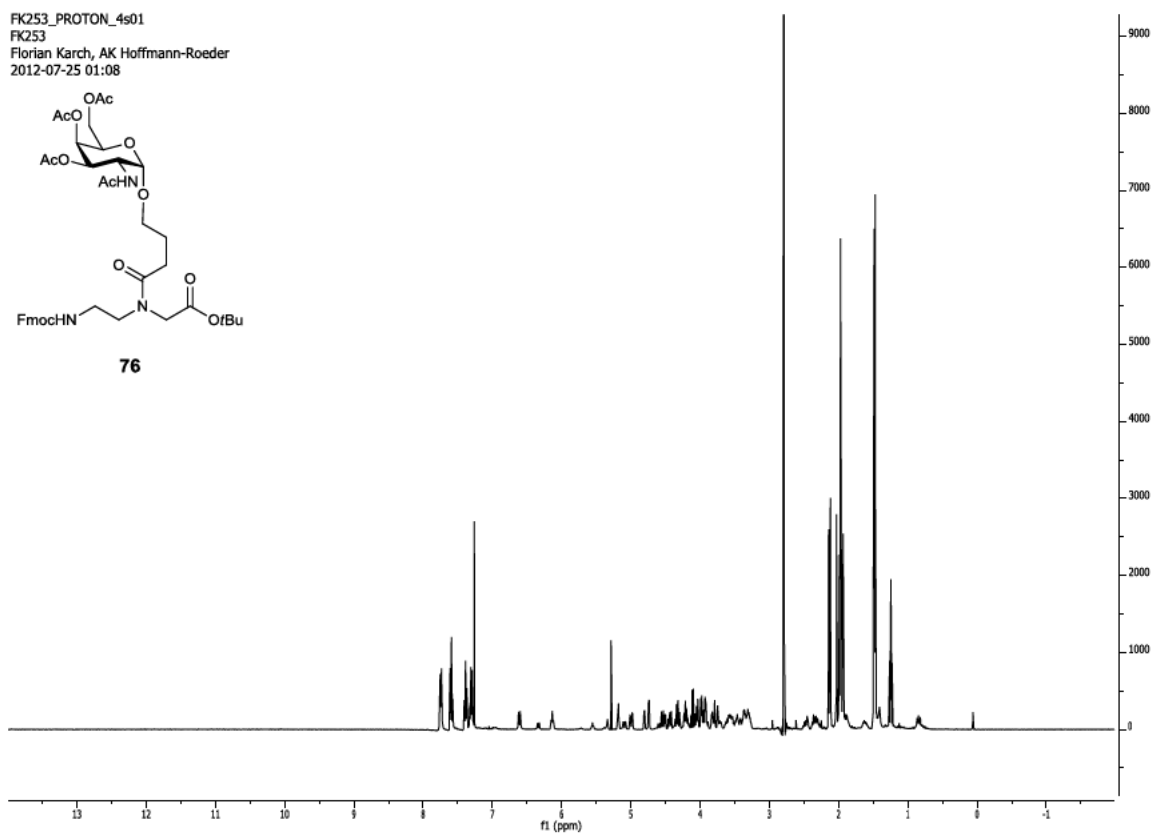
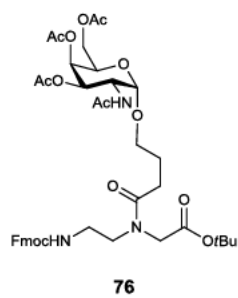
67



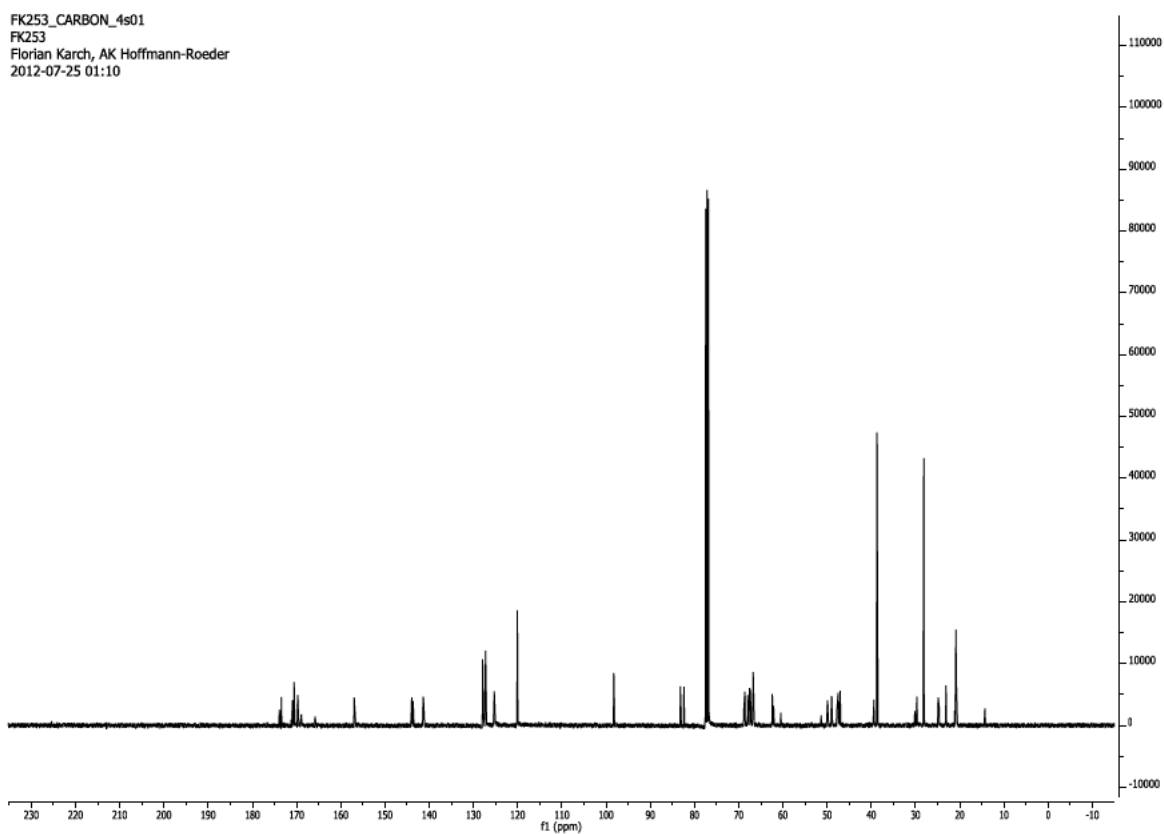
FK251\_CARBON\_601  
FK251  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-07-19 10:49

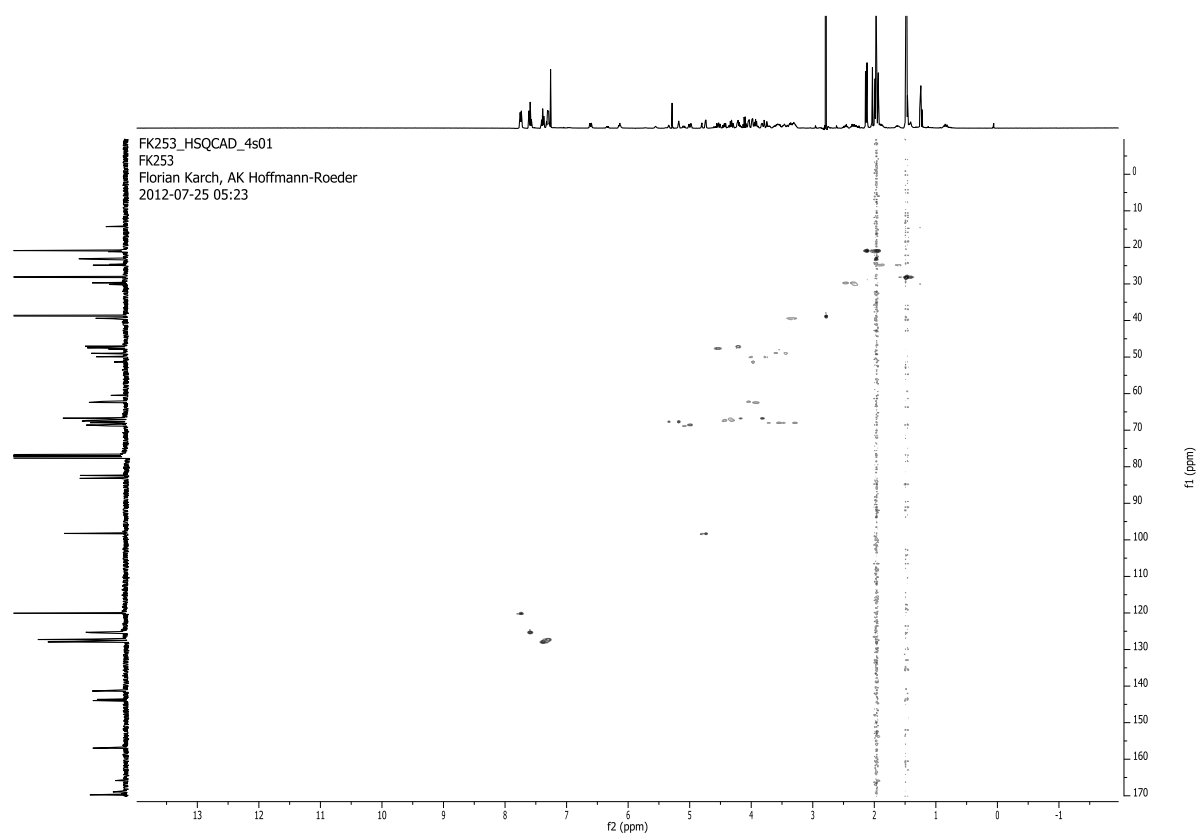
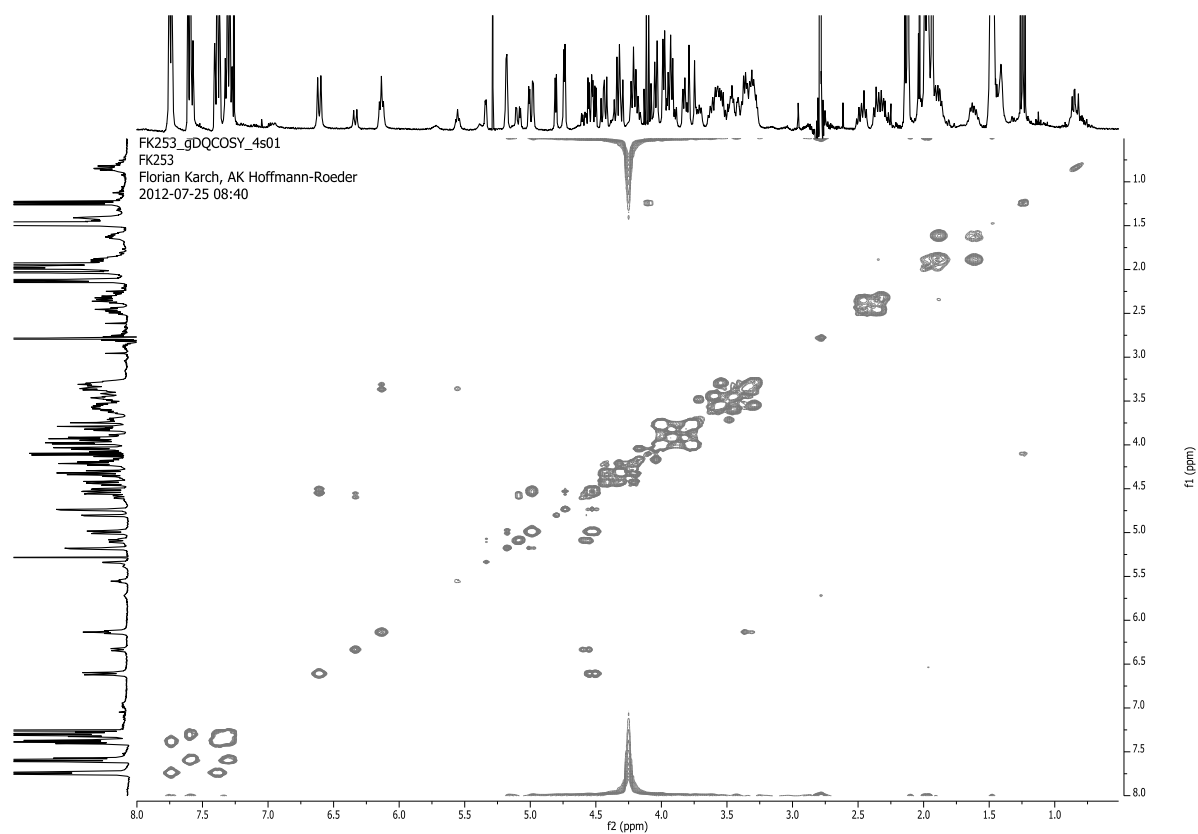


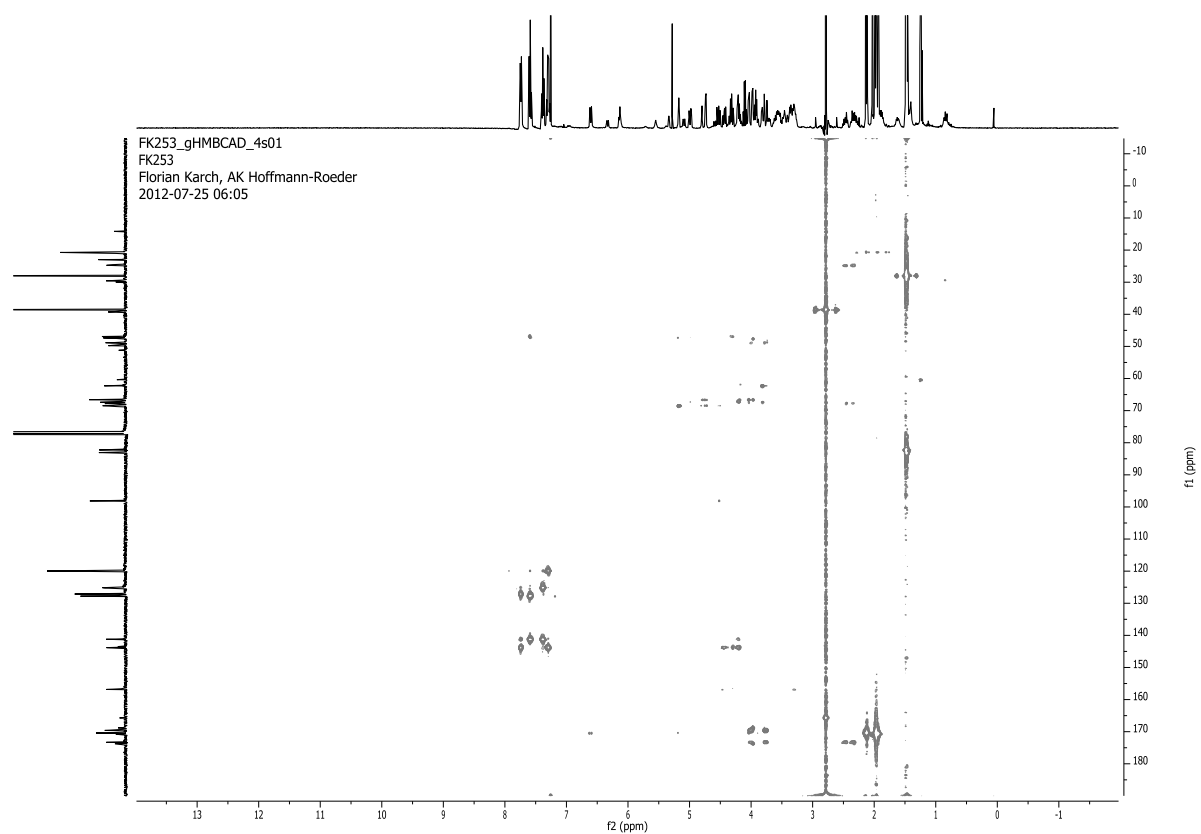
FK253\_PROTON\_4s01  
FK253  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-07-25 01:08



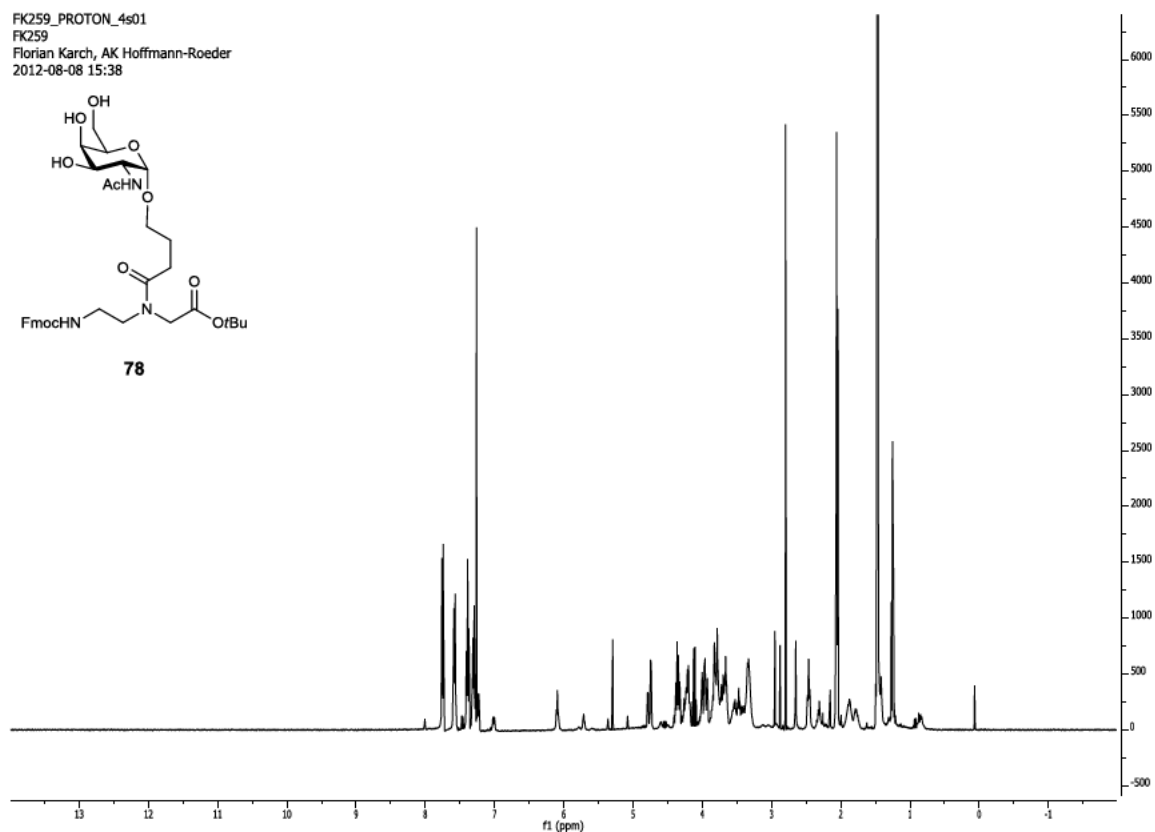
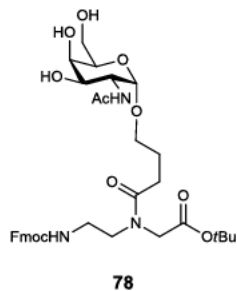
FK253\_CARBON\_4s01  
FK253  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-07-25 01:10



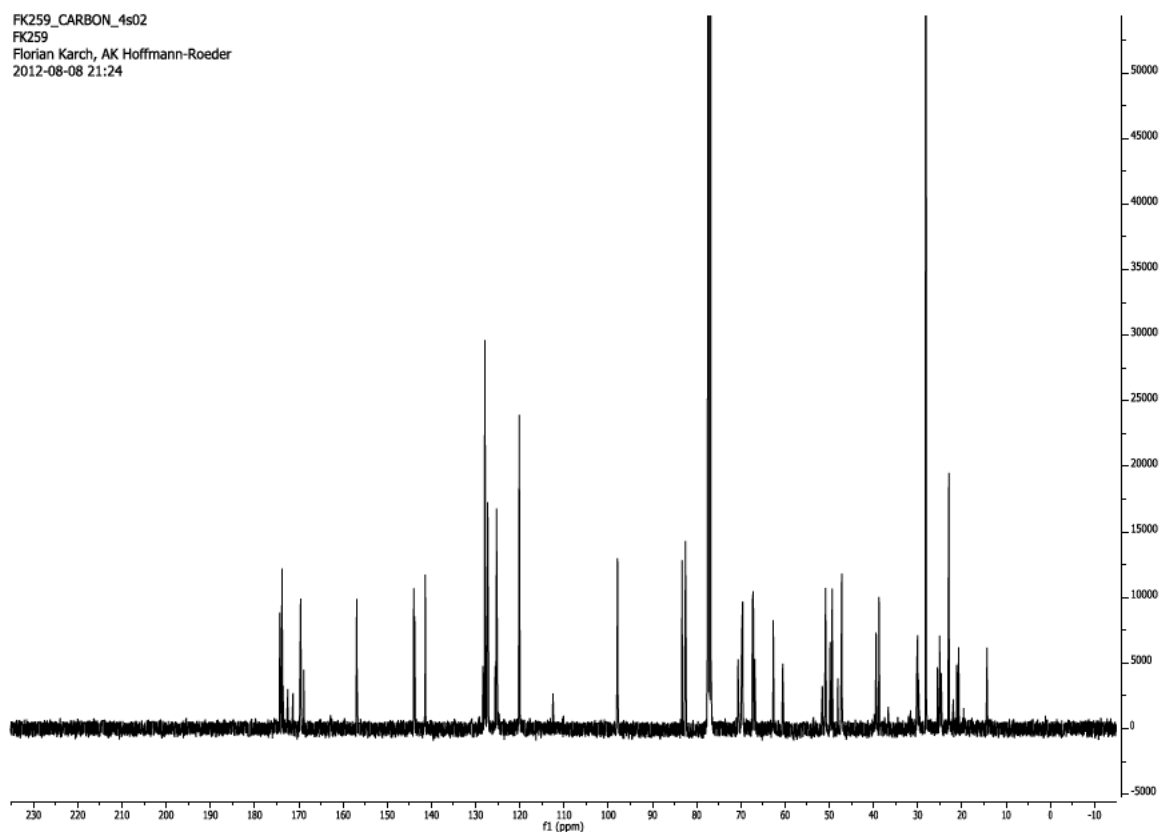


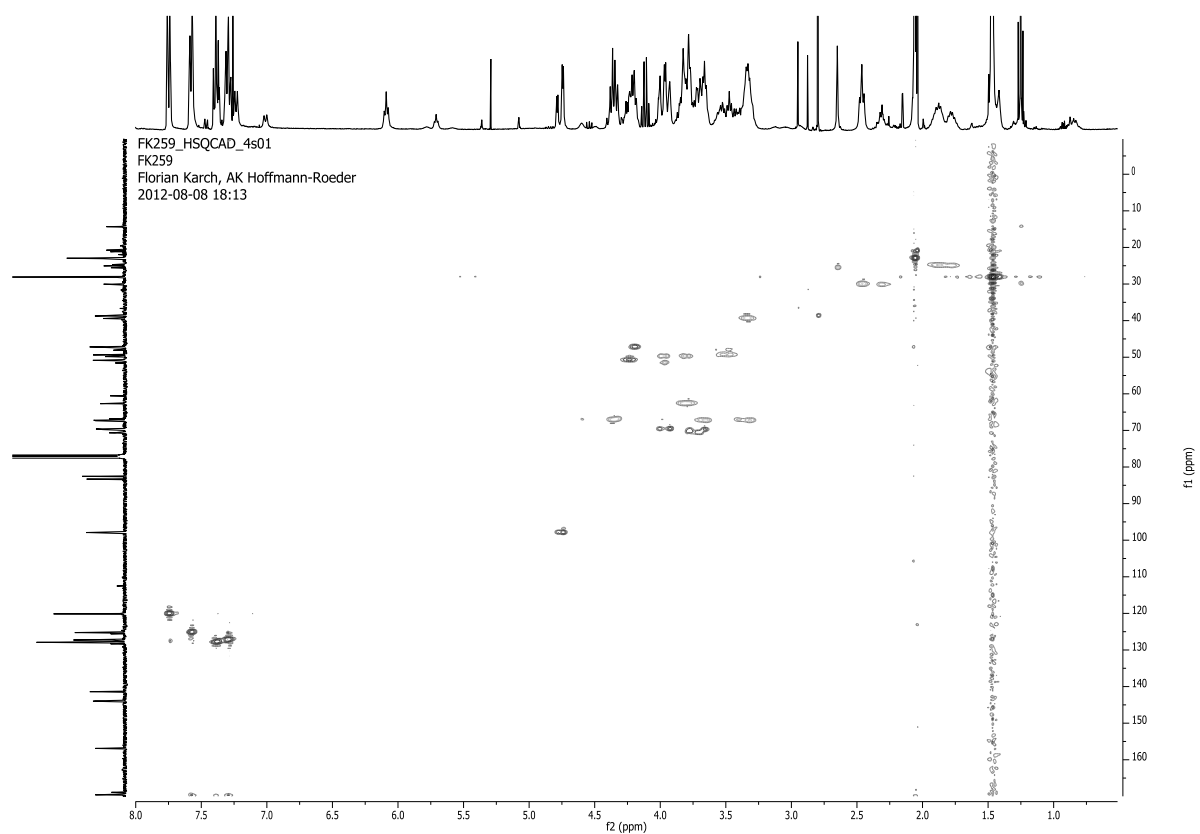
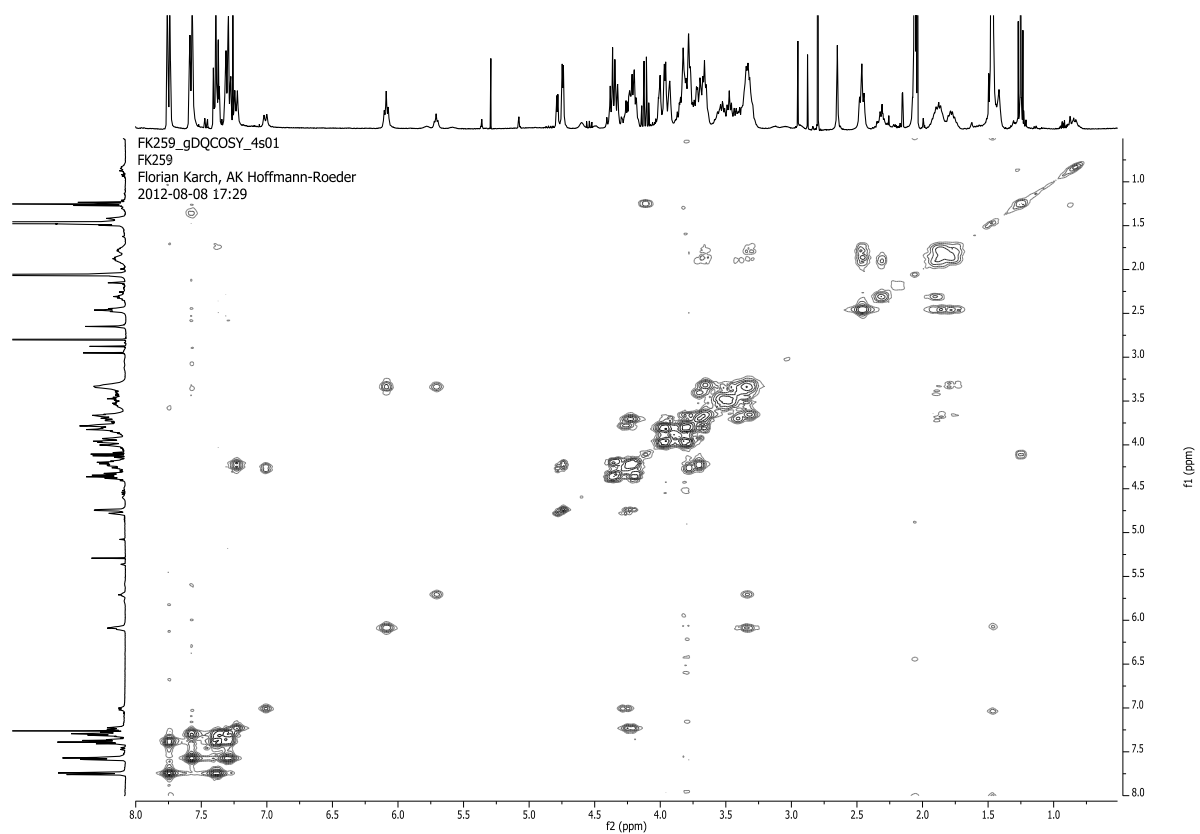


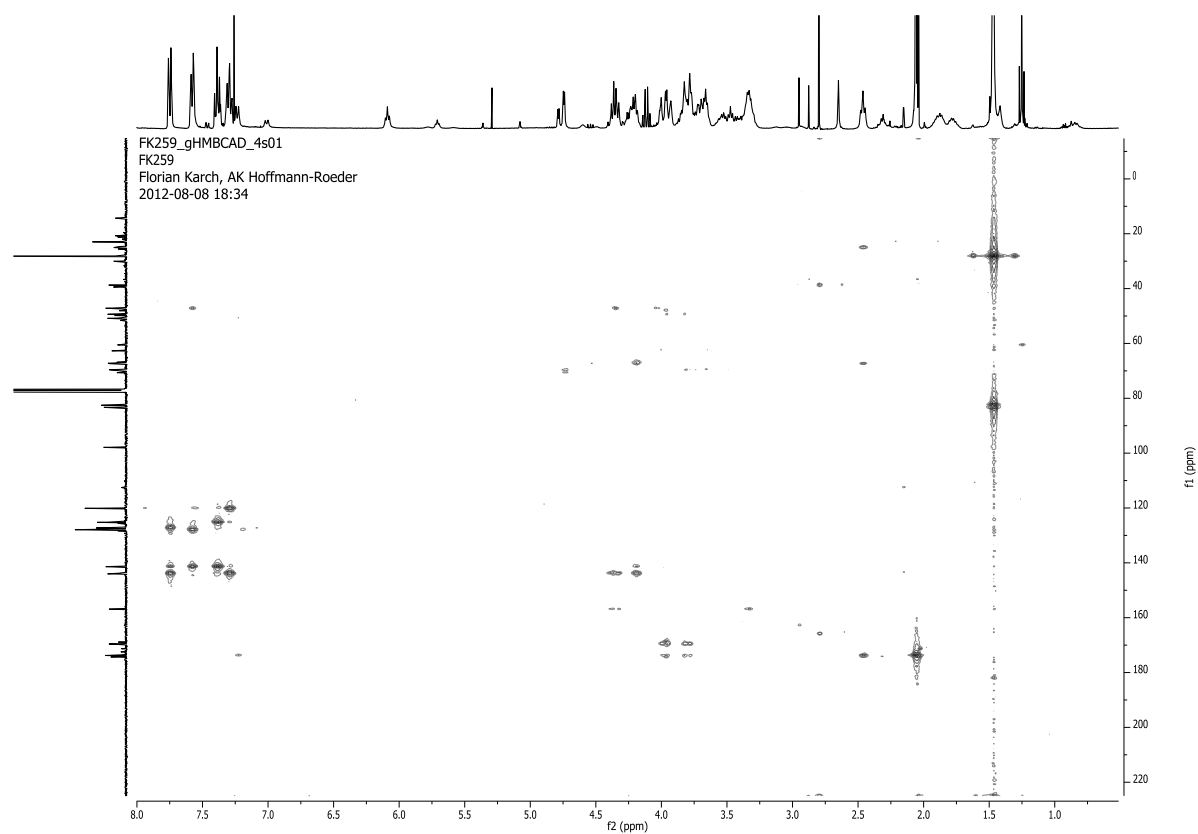
FK259\_PROTON\_4s01  
FK259  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-08-08 15:38



FK259\_CARBON\_4s02  
FK259  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-08-08 21:24

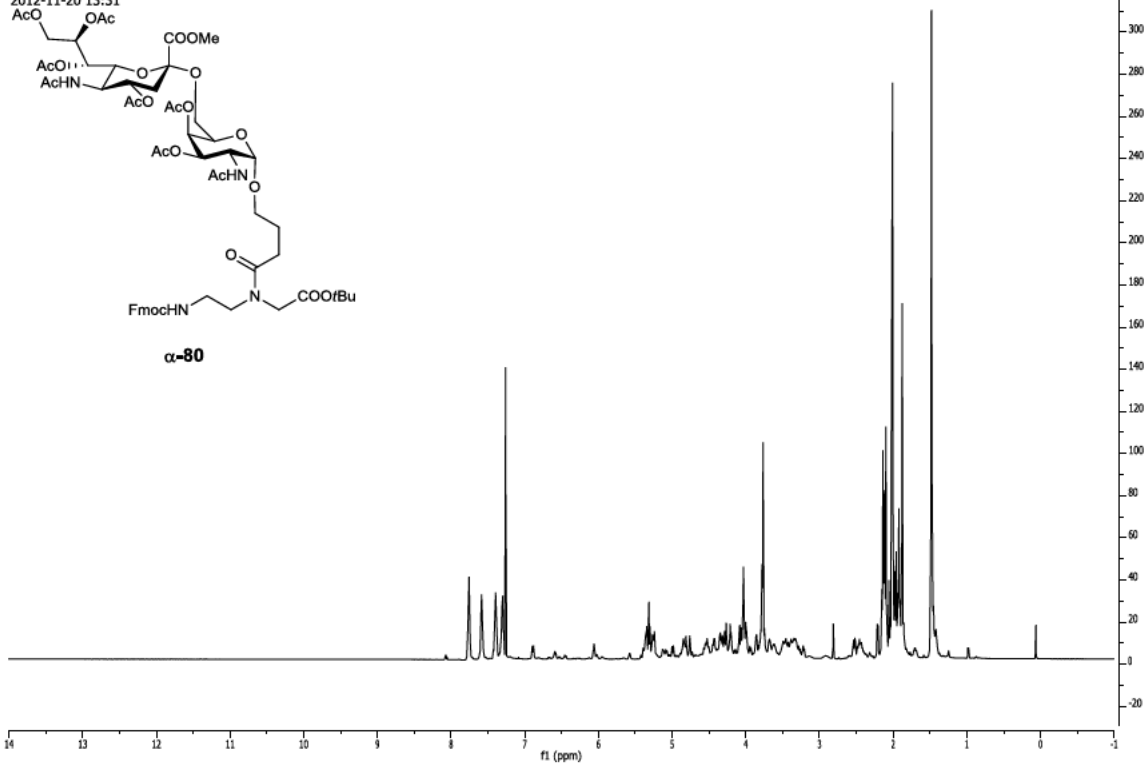








FK280\_2\_PROTON\_601  
FK280\_2  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-11-20 13:31



FK280\_2\_CARBON\_601  
FK280\_2  
Florian Karch, AK Hoffmann-Roeder  
2012-11-20 13:32

